



**Tânia Raquel
Gomes Carvalho**

**ELISA: uma técnica promissora na monitorização de
contaminantes emergentes no ambiente**



**Tânia Raquel
Gomes Carvalho**

**ELISA: uma técnica promissora na monitorização de
contaminantes emergentes no ambiente**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, realizada sob a orientação científica do Doutor Valdemar Inocêncio Esteves, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, da Doutora Diana Luísa Duarte de Lima, Estagiária de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e da Doutora Carla Patrícia Gonçalves Silva, Bolseira de Investigação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Ana Paula Gomes Fonseca

professora adjunta da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra

Prof. Doutor Valdemar Inocêncio Esteves

professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao professor Doutor Valdemar Esteves, orientador deste trabalho, o meu sincero agradecimento pela disponibilidade prestada, pela simpatia e pela alegria que sempre me incentivava.

Às investigadoras Diana Lima e Patrícia Silva, co-orientadoras deste trabalho, por todos os conhecimentos que me transmitiram, por me incentivarem a fazer um bom trabalho, por toda a ajuda prestada e principalmente por toda a paciência e apoio que me deram. O meu sincero agradecimento, sempre soube que fiz a escolha certa.

A todo o grupo do laboratório 29.2.16 (LOPNOM), que sempre se prontificaram a ajudar-me durante todo este percurso.

Aos meus pais, por sempre me apoiarem e me incentivarem a seguir em frente neste percurso e nunca me deixarem desistir. Pelo esforço enorme que fizeram para que eu atingisse este objetivo. Por toda a sabedoria que me transmitiram. Um enorme obrigada a vocês por tudo aquilo que sou.

Aos meus irmãos e aos meus tios, que sempre me apoiaram e acreditaram que eu iria conseguir alcançar este objetivo. Sem dúvida que com vocês a vida é sempre mais animada.

A todos os meus amigos, em especial Inês, Ana, Nathalie, Sofia e Cindy que sempre estiveram presentes nos momentos bons e principalmente nos momentos menos bons.

palavras-chave

17 β -estradiol; 17 α -etinilestradiol; cafeína; carbamazepina; cetirizina; ELISA; DLLME

resumo

Nas últimas duas décadas, estudos relacionados com a ocorrência e destino de contaminantes emergentes no ambiente aquático, têm recebido grande atenção por parte da comunidade científica internacional. A presença destes compostos, principalmente compostos disruptores endócrinos e fármacos, é particularmente importante uma vez que se sabe que podem causar efeitos adversos no ambiente aquático, mesmo em concentrações extremamente baixas.

Esta tese tem como objetivo desenvolver metodologias que permitam a monitorização de estrogénios e fármacos em diferentes matrizes aquosas. Os compostos escolhidos foram o 17 α -etinilestradiol (EE2), o 17 β -estradiol (E2), a carbamazepina (CBZ), a cetirizina (CET) e a cafeína (CAF).

Os estrogénios, como o EE2 e o E2, são capazes de induzir disrupção endócrina, representando sérios riscos para a população aquática e, possivelmente, para a saúde humana. No que diz respeito aos fármacos, a CBZ como antiepilético e a CET enquanto anti-histamínico, são detetados frequentemente no ambiente aquático, sendo ambos considerados tóxicos para a população aquática.

A CAF é a substância mais consumida a nível global e é relativamente estável sob condições ambientais variáveis, sendo importante a sua monitorização uma vez que é considerada como um marcador de poluição antropogénica.

A técnica de ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*, foi a técnica escolhida para a monitorização destes compostos e, uma vez que os níveis expectáveis de E2 e EE2 no ambiente são extremamente baixos, recorreu-se a uma metodologia de pré-concentração, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).

Por fim, foi realizado um estudo sazonal e espacial no ambiente aquático na região centro de Portugal. O E2 foi quantificado entre 5 e 87 ng L⁻¹ e o EE2 entre 2 e 17 ng L⁻¹. Os níveis de concentração encontrados para a CBZ e para a CET foram 10-1290 ng L⁻¹ e 10-190 ng L⁻¹ respetivamente. Por fim a CAF foi quantificada entre 62 e 6399 ng L⁻¹.

keywords

17 β -estradiol; 17 α -ethinylestradiol; caffeine; carbamazepine; cetirizine; ELISA; DLLME

abstract

During the last two decades, studies related to the occurrence and fate of emerging contaminants in the aquatic environment have received great attention from the international scientific community. The presence of these compounds, especially endocrine disruptors and pharmaceuticals, is particularly important since they are known to induce adverse effects in aquatic environments, even at extremely low concentrations.

This thesis aimed to develop methodologies that allow the monitoring of estrogens and pharmaceuticals in different water matrices. The compounds chosen were 17 α -ethinylestradiol (EE2), 17 β -estradiol (E2), carbamazepine (CBZ), cetirizine (CET) and caffeine (CAF).

Estrogens, such as EE2 and E2, are known to induce endocrine disruption, representing a serious risk to aquatic population, and possibly to human health. With respect to pharmaceuticals, CBZ as an antiepileptic and CET as an antihistamine, are frequently detected in the aquatic environment. CBZ and CET are considered toxic to the aquatic population. CAF is the most consumed substance at a world scale and it is relatively stable under variable environmental conditions. Thus, CAF monitoring is important since it is considered an anthropogenic marker.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was chosen for monitoring these compounds. In the case of E2 and EE2, since the levels expected in the environment are extremely low, a pre-concentration methodology, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) was used.

Finally, a seasonal and spatial study was carried out in the aquatic environment in the central region of Portugal. E2 was quantified between 5 and 87 ng L⁻¹ and EE2 between 2 and 17 ng L⁻¹. The concentration levels found for CBZ and CET were 10-1290 ng L⁻¹ and 10-190 ng L⁻¹ respectively. Finally, CAF was quantified between 62 and 6399 ng L⁻¹.

Abreviaturas

4PL	Quatro Parâmetros Logarítmicos
Ab	Anticorpo
AH	Ácidos Húmicos
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês B ovine S erum A lbumin)
CAF	Cafeína
CBZ	Carbamazepina
CDEs	Compostos D isruptores E ndócrinos
CET	Cetirizina
CEs	Contaminantes E mergentes
CPE-LC-UV	<i>Cloud Point Extraction</i> com Cromatografia Líquida acoplada ao detector de Ultravioleta (do inglês <i>Cloud Point Extraction-Liquid Chromatography-Ultraviolet</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês <i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i>)
DMA	D imetilacetamida
DO	D ensidade ótica
E1	E strona
E2	17 β - E stradiol
E3	E striol
EDTA	Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético dihidratado
EE2	17 α - E tinilestradiol
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ESI	Ionização <i>electrospray</i> (do inglês <i>Electrospray Ionization</i>)
ETAR	Estação de Tratamento de Águas Residuais
Ig	Imunoglobulina
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
GC-MS/MS	<i>Gas Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>
K _{OA}	Coefficiente de Partição octanol/água

LC-DAD	Cromatografia líquida acoplada ao detetor de díodos (do inglês <i>Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i>)
LC-DAD-MS	Cromatografia líquida acoplada ao detetor de díodos de <i>array</i> (do inglês <i>Liquid Chromatography-Diode Array Detector-Mass Spectrometry</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>
LC-UV	<i>Liquid Chromatography-Ultraviolet</i>
LDD	L imite de d eteção
LDQ	L imite de q uantificação
MOD	M atéria O rgânica D issolvida
MOP	M atéria O rgânica P articulada
PBS	Solução tampão fosfato (do inglês <i>phosphate buffer solution</i>)
POPs	P oluentes O rgânicos P ersistentes
PPCPs	Produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais (do inglês <i>Pharmaceutical and Personal Care Products</i>)
RC	R eatividade C ruzada
RIA	Radioimunoensaios (do inglês <i>Radioimmunoassay</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>)
SNS	S erviço N acional de S aúde
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME-LC-UV	Microextração em fase sólida com cromatografia líquida acoplada ao detetor ultravioleta ao detetor de díodos (do inglês <i>Solid Phase Microextraction-Liquid Chromatography- Ultraviolet</i>)
T	Marcador enzimático (<i>Tracer</i>)
TBABH	Hidreto de boro de tetrabutilamônio
TMB	T etrametil b enzidina
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry</i>)

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO TEÓRICA	1
1.1.	Contaminantes emergentes no ambiente	3
1.1.1.	Fontes, ocorrência e efeitos	5
1.1.2.	Vias e Destino	11
1.1.3.	CDEs e PPCPs em Portugal	12
1.1.4.	Métodos analíticos para a quantificação de CDEs e PPCPs em matrizes ambientais aquáticas	16
1.2.	Imunoensaios.....	18
1.2.1.	Anticorpos	18
1.2.1.1.	Propriedades estruturais e funcionais	19
1.2.1.2.	Síntese de Abs.....	20
1.2.2.	Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	21
1.2.2.1.	Curva de calibração em ELISA	23
1.2.2.2.	Reatividade Cruzada	25
1.2.3.	Técnicas de pré-concentração acopladas a ELISA	25
1.2.3.1.	Extração em Fase Sólida.....	25
1.2.3.2.	Microextração Líquido-Líquido Dispersiva	26
1.2.3.2.1.	Fatores a otimizar.....	27
1.3.	Objetivo da Tese.....	31
2.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
2.1.	Equipamentos	35
2.2.	Soluções e Reagentes	35
2.3.	Locais de amostragem.....	36
2.4.	Aplicação da DLLME para posterior quantificação de E2 e EE2 por ELISA.....	38
2.4.1.	Metodologia para DLLME.....	38
2.4.2.	Metodologia para ELISA	38
2.5.	Metodologia de ELISA para a CBZ.....	39
2.6.	Metodologia de ELISA para a CET	40
2.7.	Metodologia de ELISA para a CAF.....	40
3.	DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	43

3.1. Adaptação da técnica ELISA para aplicação na determinação de E2 e EE2 em amostras ambientais.....	45
3.1.1. Otimização das diluições de Ab e de T	45
3.1.2. Efeito da matéria orgânica na utilização da DLLME na quantificação de E2 e EE2 por ELISA	47
3.2. Adaptação da técnica ELISA para determinação de CAF e CBZ em amostras ambientais.....	49
3.2.1. Otimização das diluições de Ab e de T	49
3.3. Determinação de E2, EE2, CBZ, CET e CAF em amostras reais	52
3.3.1. Caracterização das amostras.....	53
3.3.1.1. Carbono Orgânico Dissolvido	53
3.3.1.2. Espectroscopia UV-Visível	53
3.3.1.3. Salinidade e pH	55
3.3.2. Variação sazonal.....	57
3.3.3. Variação espacial.....	61
4. CONCLUSÃO	65
5. BIBLIOGRAFIA.....	69
6. ANEXOS.....	79

Índice de figuras

Figura 1. Esquematização de possíveis fontes de CEs para o ambiente (adaptado de Zhang et al., 2014).	5
Figura 2. Distribuição espacial de CEs em águas superficiais em Portugal (adaptado de Ribeiro et al., 2016).	13
Figura 3. Estrutura básica de um Ab (IgG) (adaptado de Holliger e Hudson, 2005).	19
Figura 4. Preparação de Abs monoclonais (adaptado de Mikkelsen e Cortón, 2004).	21
Figura 5. Método ELISA não competitivo (adaptado de Lima, 2011).	22
Figura 6. Método ELISA competitivo direto (adaptado de Lima, 2011).	23
Figura 7. Método ELISA competitivo indireto (adaptado de Lima, 2011).	23
Figura 8. Curva de calibração típica em ELISA (adaptado de Silva, 2014).	24
Figura 9. Procedimento de DLLME (adaptado de Martins et al., 2012).	27
Figura 10. Localização dos locais de amostragem próximos do parque do Choupal, Coimbra.	37
Figura 11. Localização dos locais de amostragem na Figueira da Foz.	37
Figura 12. Curvas de calibração do E2 usando diferentes combinações de diluições de Ab e T. Ab 1:5 000, T 1:50 000 – vermelho; Ab 1:10 000, T 1:5 000 – azul; Ab 1:10 000, T 1:7 500 – verde; Ab 1:25 000, T 1:5 000 – laranja.	45
Figura 13. Curvas de calibração usando diferentes combinações de diluições de Ab e T. Ab 1:25 000, T 1:100 000 – vermelho; Ab 1:50 000, T 1:100 000 – azul; Ab 1:50 000, T 1:50 000 – verde; Ab 1:50 000, T 1:75 000 – laranja;	46
Figura 14. Avaliação do efeito da matéria orgânica num ensaio ELISA para o E2. Ausência de AH - vermelho; presença de 20 mg L ⁻¹ AH – azul.	48
Figura 15. Avaliação da matéria orgânica num ensaio de ELISA para o EE2. Ausência de AH - vermelho; Presença de 20 mg L ⁻¹ AH - azul	49
Figura 16. Curvas de calibração usando diferentes diluições de Ab e T. Ab 0,3: 21 500, T 15:6 000 – vermelho; Ab 0,5:21 500, T 18:6 000 – verde.	50
Figura 17. Curvas de calibração usando diferentes combinações de diluições de Ab e T. Ab 1:100 000, T 1:100 000 – vermelho; Ab 1:100 000, T 1:300 000 – azul; Ab 1:100 000, T 1:500 000 – verde; Ab 1:75 000, T 1:300 000 – laranja.	51
Figura 18. Espectros de UV-Visível das amostras recolhidas.	54

Figura 19. Valores de concentração de E2 quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens.	57
Figura 20. Valores de concentração de EE2 quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens.	58
Figura 21. Valores de concentração de CBZ quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens	58
Figura 22. Valores de concentração de CET quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens	59
Figura 23. Valores de concentração de CAF quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens.	60
Figura 24. Representação das concentrações dos diferentes compostos ao longo dos pontos de amostragem estudados.....	61

Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de CEs e respectivas estruturas (adaptado de Chang et al., 2009).....	4
Tabela 2. Concentração de hormonas em efluentes de ETARs (adaptado de Ying et al., 2002).....	6
Tabela 3. Concentração de hormonas em águas superficiais (adaptado de Ying et al., 2002).....	7
Tabela 4. Concentrações de CBZ em águas residuais.	8
Tabela 5. Estudo sazonal em influentes e efluentes de uma ETAR na Grécia (adaptado de Papageorgiou et al., 2016).	9
Tabela 6. Concentrações de CAF em ETARs.	10
Tabela 7. Concentrações de CAF em águas superficiais.	11
Tabela 8. Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.	11
Tabela 9. Estudos de quantificação de E2 e EE2 em Portugal.	14
Tabela 10. Ocorrência de CDEs e PPCPs em águas portuguesas (adaptado de Ribeiro et al., 2016).	15
Tabela 11. Comparação da DLLME com outros métodos de pré-concentração para a determinação da E1 e do E2, por LC-UV, em amostras de águas (adaptado de Du et al., 2010).	29
Tabela 12. Determinação de E2 e EE2 em águas provenientes de fontes públicas (água potável), águas superficiais e residuais sujeitas a DLLME e analisadas por ELISA (adaptado de Lima et al., 2014).	30
Tabela 13. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para o E2.	46
Tabela 14. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para o EE2.	47
Tabela 15. Parâmetros das curvas 4PL relativas ao E2.	48
Tabela 16. Parâmetros das curvas 4PL relativas ao EE2.....	49
Tabela 17. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para a CBZ.	51
Tabela 18. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para a CAF.	52

Tabela 19. Análises de DOC realizadas às amostras recolhidas nas três amostragens.	53
Tabela 20. Salinidade das amostras recolhidas na amostragem de outubro.....	56
Tabela 21. Valores de pH das amostras nas 3 amostragens efetuadas.	56
Tabela 22. Concentrações obtidas de E2, EE2, CBZ, CET e CAF nos locais de amostragem recolhidos no rio Mondego.	81

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1. Contaminantes emergentes no ambiente

1.1.1. Fontes e efeitos adversos

1.1.2. Vias e destino

1.1.3. CDEs e PPCPs em Portugal

1.1.4. Métodos analíticos para a quantificação de CDEs e PPCPs em matrizes ambientais aquáticas

1.2. Imunoensaios

1.2.1. Anticorpos

1.2.2. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

1.2.3. Técnicas de Pré-concentração acopladas a ELISA

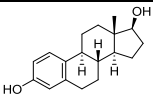
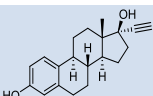
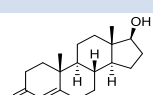
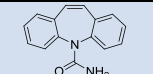
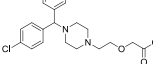
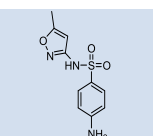
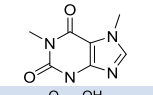
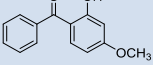
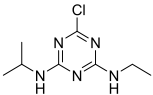
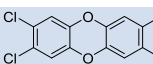
1.1. Contaminantes emergentes no ambiente

Nas últimas décadas, surgiu uma preocupação relacionada com a presença dos contaminantes emergentes (CEs) no ambiente, por serem potenciais ameaças para o mesmo e, eventualmente, para a saúde humana (Yao et al., 2011). Estes contaminantes são substâncias naturais ou sintéticas que podem causar efeitos indesejáveis nos seres vivos. A sua presença no ambiente não é recente, mas a sua identificação tem-se tornado cada vez mais fácil graças, não só ao aperfeiçoamento de técnicas existentes, como ao desenvolvimento de novas técnicas analíticas (Silva, 2014).

Na União Europeia, a Diretiva-Quadro da Água (Diretiva 2000/60/EC; Barbosa et al., 2016) regula as normas de qualidade das águas subterrâneas e superficiais, definindo os contaminantes de alto risco que devem ser considerados prioritários no ambiente aquático, nomeadamente, pesticidas e produtos resultantes da sua degradação, solventes clorados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e compostos orgânicos voláteis. No entanto, ainda existe um vasto número de contaminantes que não está contemplado na lista de poluentes prioritários. Todavia, o número de compostos considerados para monitorização (e eventual passagem à lista de substâncias prioritárias) tem vindo a crescer desde 2013 (Diretiva 2013/39/UE; Decisão 2015/495/UE; Silva, 2014).

Os CEs incluem uma vasta gama de substâncias, tais como produtos farmacêuticos e produtos de cuidados pessoais (PPCPs, do inglês *Pharmaceutical and Personal Care Products*), compostos disruptores endócrinos (CDEs) e poluentes orgânicos persistentes (POPs) (Silva, 2014). Na Tabela 1, apresentam-se alguns exemplos de CEs, quer de origem natural, quer de origem sintética. Todos os compostos da Tabela 1 apresentam na sua estrutura molecular um anel aromático o que lhes confere características hidrofóbicas.

Tabela 1. Exemplos de CEs e respectivas estruturas (adaptado de Chang et al., 2009).

Classe	Composto	Estrutura
Esteróides	Estrogénio	17 β -Estradiol (E2) 
	Estrogénio	17 α -Etinilestradiol (EE2) 
	Androgénio	Testosterona 
Fármacos	Antiepilético	Carbamazepina 
	Anti-histamínico	Cetirizina 
	Antibiótico	Sulfametoxazol 
Produtos de Cuidados Pessoais	Estimulante	Cafeína 
	Protetores Solares	Oxibenzona 
POPs	Herbicida	Atrazina 
	Produtos de combustão	Dioxina 

No grupo dos PPCPs incluem-se substâncias químicas, quer de origem natural quer de origem sintética, utilizadas na área da saúde (por exemplo, os fármacos) e na área dos produtos de cuidados pessoais (como os cosméticos e as fragrâncias) (Silva, 2014). Apesar de serem substâncias que ocorrem no ambiente em concentrações vestigiais, podem afetar o crescimento, a reprodução e o desenvolvimento dos organismos no ecossistema aquático (Bolong et al., 2009). Os CDEs são uma classe de substâncias químicas que perturbam o sistema endócrino imitando, inibindo, bloqueando ou até interrompendo a função das hormonas naturais, nomeadamente, dos estrogénios, dos androgénios e/ou das hormonas

tiróideas, afetando assim a saúde humana e de outras espécies. Uma característica associada aos CDEs, e que contribui para o risco que representam, é o facto de serem solúveis nos tecidos adiposos (Quan et al., 2005). Tal como no caso dos PPCPs, foi evidenciado que, apesar deste tipo de compostos estar presente no ambiente em concentrações vestigiais (na gama dos ng L^{-1}), causam efeitos adversos na biota aquática (Chang et al., 2009; Gomes e Lester, 2003).

As hormonas estrogénicas e os PPCPs são os que se apresentam em maiores concentrações nas águas residuais, sendo que as primeiras são alvo de uma preocupação maior, uma vez que o seu poder disruptor pode ser cerca de mil vezes superior ao de outros produtos químicos (Bolong et al., 2009).

1.1.1. Fontes, ocorrência e efeitos

A maior fonte de CEs no ambiente resulta da excreção humana e animal e da consequente remoção incompleta durante os processos de tratamento das águas residuais, os quais se revelam inadequados para este tipo de contaminantes (Liu et al., 2009). A Figura 1 esquematiza possíveis fontes de CEs para o ambiente.



Figura 1. Esquematização de possíveis fontes de CEs para o ambiente (adaptado de Zhang et al., 2014).

As primeiras informações relatadas acerca dos CDEs encontravam-se relacionadas com a remoção incompleta de esteroides durante o tratamento de águas residuais (Gomes et al., 2003). Nos anos 70 e 80, a presença de hormonas humanas e de fármacos foi detetada, não só no processo de tratamento de águas residuais, mas também em águas descarregadas no ambiente aquático (Chang et al., 2009). Até ao momento, já foram detetados em águas subterrâneas, efluentes de águas residuais e em águas superficiais, inclusive na água do mar (Chang et al., 2009).

Têm vindo a realizar estudos em diversos países sobre a quantificação de hormonas na água. No Brasil, o E2 foi encontrado em amostras de efluentes do tratamento de águas residuais numa concentração média de 21 ng L⁻¹ (Ternes et al., 1999). Em França, o E2 e o EE2 foram quantificados em influentes e efluentes de ETARs, bem como em rios, sendo que os valores médios para o E2 foram 14,3, 6,7 e 2,3 ng L⁻¹ e para o EE2 foram 6,1, 3,7 e 1,8 ng L⁻¹ em influentes, efluentes e águas superficiais, respetivamente (Cargöuet et al., 2004). Na China, o E2 e o EE2 foram quantificados em águas superficiais doces em concentrações até 31,4 e 24,4 ng L⁻¹, respetivamente (Rao et al., 2013). Ying et al. (2002), relataram que os esteroides estrogénicos foram detetados em efluentes de ETARs em diferentes países com concentrações na gama de 70 ng L⁻¹ para a estrona (E1), 64 ng L⁻¹ para o E2, 18 ng L⁻¹ para o estriol (E3) e 42 ng L⁻¹ para o EE2. Na Tabela 2, apresentam-se as diferentes concentrações destas hormonas em efluentes de ETARs em diversos países.

Tabela 2. Concentração de hormonas em efluentes de ETARs (adaptado de Ying et al., 2002).

Localização	Concentração (ng L ⁻¹) ^a			
	E1	E2	E3	EE2
Alemanha	<LOD-70 (9)	<LDD-3(<LDD)	-	<LDD-15 (1)
Canadá	<LOD-48 (3)	<LDD-64 (6)	-	<LDD-42 (9)
Estados Unidos da América	-	0,477-3,66 (0,9)	-	<LDD-0,759 (0,248)
Holanda	<0,4-47 (4,5)	<0,1-5,0 (<LDD)	-	<0,2-7,5 (<LDD)
Itália	2,5-82,1 (9,3)	0,44-3,3 (1,0)	0,43-18 (1,3)	<LOD-1,7 (0,45)
Japão	-	<LDD-55	-	-
Reino Unido	1,4-76 (9,9)	2,7-48 (6,9)	-	<LDD-7 (<LDD)

a) Gama de concentrações e mediana entre parênteses

Na Tabela 3, apresentam-se concentrações, das mesmas hormonas, reportadas para águas superficiais.

Tabela 3. Concentração de hormonas em águas superficiais (adaptado de Ying et al., 2002).

Localização	Concentração (ng L ⁻¹) ^a			
	E1	E2	E3	EE2
Alemanha	0,10-4,1 (0,40)	0,15-3,6 (0,3)	-	0,10-5,1 (0,4)
Holanda	<0,1-3,4 (0,3)	<0,3-5,5 (<0,3)	-	<0,1-4,3 (<0,1)
Itália	1,5	0,11	0,33	0,04
Japão	-	<LDD-27 (2,1)	-	-

a) Gama de concentrações e mediana entre parênteses

A carbamazepina (CBZ) é um composto biologicamente ativo que se destaca na sua categoria de antiepilético por estar entre os fármacos mais encontrados numa grande variedade de matrizes aquosas, tais como: efluentes de ETARs, águas subterrâneas, águas de superfície e águas para consumo humano (Calisto et al., 2011). A CBZ tem sido considerada, em diversos estudos (Bahlmann et al. 2012, Calisto et al. 2011), como um indicador de poluição antropogénica, ou seja, indicador de poluição decorrente da atividade humana. Assim, a avaliação dos níveis de contaminação por parte deste composto pode ser uma ferramenta muito útil para a identificação de pontos focais de poluição (Bahlmann et al., 2012). Nos últimos anos, a CBZ tem estado entre os medicamentos mais prescritos em Portugal, com um consumo estimado de cerca de 300 000 embalagens por ano (Infarmed, 2014); por esta razão, torna-se importante a monitorização deste fármaco no ambiente. Na tabela seguinte (Tabela 4) estão representados alguns valores de concentração de CBZ em influentes e efluentes de ETARs de alguns países. Os valores apresentados encontram-se entre 0,055 ng L⁻¹ e 2,0 ng L⁻¹, sendo o valor mais baixo correspondente à quantificação de CBZ na Coreia do Sul e o valor mais elevado relativo à Alemanha. De um modo geral, verifica-se que não existem diferenças significativas entre os níveis de CBZ quantificados em influentes e efluentes o que indica que os diferentes tipos de tratamentos aplicados nas ETARs não são eficientes na remoção da CBZ nas águas residuais.

Tabela 4. Concentrações de CBZ em águas residuais.

Localização	CBZ (ng L ⁻¹)		Referência
	Influente	Efluente	
Alemanha	1,9	2,0	(Bahlmann et al., 2014)
Coreia do Sul	0,072	0,055	(Behera et al., 2011)
Espanha	0,53	0,58	(Santos et al., 2009)
Grécia	0,57	0,30	(Stamatis e Konstantinou, 2013)
Portugal	0,47	0,52	(Bahlmann et al., 2014)

A cetirizina (CET) é um fármaco que pertence à classe dos anti-histamínicos (Calisto, 2011). Os anti-histamínicos são usados no tratamento de reações alérgicas sazonais (por exemplo, febre dos fenos) pelo que, esse facto, se pode refletir em variações sazonais das concentrações destes fármacos em águas residuais e, consequentemente, nas suas descargas no ambiente aquático (Kosonen e Kronberg, 2009).

A CET apresenta-se como um dos fármacos com maior número de embalagens vendidas anualmente, em termos de medicamentos genéricos por substância ativa no Serviço Nacional de Saúde (SNS), com cerca de 350 0000 embalagens (Infarmed, 2014). Além disso, está reportado na literatura que mais de 60% das preparações de anti-histamínicos contêm CET (Kosonen e Kronberg, 2009).

A Tabela 5 é representativa de uma parte de um estudo sazonal realizado na Grécia em que se avalia a presença de CBZ e CET em influentes e efluentes de ETAR. Este estudo teve a duração de um ano e tanto a CBZ com a CET foram sempre detetadas em todas as análises realizadas. Neste estudo verificam-se valores de CBZ e de CET superiores nos efluentes na maior parte das estações. Foi no Inverno que os autores obtiveram os valores mais elevados de CBZ e de CET.

Tabela 5. Estudo sazonal em influentes e efluentes de uma ETAR na Grécia (adaptado de Papageorgiou et al., 2016).

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a							
	Primavera		Verão		Outono		Inverno	
	I	E	I	E	I	E	I	E
CBZ	0,025	0,054	0,053	0,047	0,033	0,094	0,026	0,102
CET	0,108	0,139	0,324	0,281	0,325	0,551	0,400	0,781
I - Influyente da ETAR E - Efluente da ETAR a) Valores médios								

Os CDEs podem dispersar-se rapidamente no ambiente (Auriol et al., 2006), onde, na grande maioria dos casos, se encontram sob a forma de misturas, podendo as interações entre eles causar efeitos sinérgicos ou antagonistas. Sabe-se que, quando mais do que uma substância está presente, o poder disruptor endócrino verificado pode ser muito forte, mesmo que a ação individual seja fraca (Silva, 2014). Assim, os efeitos adversos causados pelos CDEs foram recebendo cada vez mais importância, uma vez que se notou uma relação entre a sua presença no ambiente e o impacto toxicológico em peixes (Lima et al., 2013). Vários estudos realizados sobre CDEs mostraram a ocorrência destes compostos em matrizes ambientais, sendo responsáveis por efeitos nocivos na saúde humana e de outros seres vivos (Conley et al., 2008; Jobling et al., 1998; Jorgensen e Halling-Sorensen, 2000; Ternes, 1998).

Uma das grandes preocupações em relação aos PPCPs incide no aumento da resistência bacteriana, devido à presença de antibióticos no ambiente, o que pode, a médio prazo, provocar um grave problema de saúde pública, e, também, sobre o facto dos antibióticos diminuírem a biodegradação das folhas e de outros materiais vegetais, fonte principal de alimentação dos seres vivos aquáticos em rios (Richardson e Ternes, 2011). O interesse pelo estudo destes compostos tem crescido sobretudo porque o consumo de fármacos tem aumentado continuamente, o que leva a que a taxa de introdução destes compostos no ambiente seja superior à sua taxa de degradação. No entanto, ainda não são conhecidos os riscos exatos que estão associados a décadas de exposição persistente de

combinações aleatórias de PPCPs presentes em níveis de concentração vestigiais (Jakimska et al., 2014).

Os fármacos diferem de outros poluentes orgânicos ambientais, pois podem entrar no ambiente aquático na forma de metabolitos, devido à exposição a metabolismos bioquímicos (Petrović e Barceló, 2007). Um tipo de modificação metabólica é a formação de conjugados, na qual os compostos podem ligar-se covalentemente a pequenos fragmentos orgânicos. Por outro lado, quando um composto é extensivamente metabolizado, os seus metabolitos podem reter a atividade biológica do composto inicial. Estas modificações tornam a monitorização ambiental ainda mais complexa (Silva, 2014).

A cafeína (CAF) é a substância mais consumida à escala mundial, é relativamente estável em diversas condições ambientais e apresenta uma solubilidade elevada em água e uma volatilidade negligenciável (Silva et al., 2014). Assim, a CAF tem sido considerada como marcador de poluição antropogénica, ou seja, como um indicador de poluição decorrente da presença ou atividade humana, em águas superficiais e residuais (Buerge et al., 2003; Bahlmann et al., 2012).

Apresentam-se, nas tabelas seguintes, (Tabelas 6 e 7), alguns valores de concentração de CAF em ETARs e em águas superficiais de diversos países. Analisando as tabelas, verificam-se concentrações maiores de CAF nas ETARs do que em águas superficiais. A CAF é quase totalmente removida durante o tratamento nas ETARs.

Tabela 6. Concentrações de CAF em ETARs.

Localização	CAF ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a		Referência
	Influente	Efluente	
Alemanha	470	0,22	(Bahlmann et al., 2012)
Coreia do Sul	2,35	0,018	(Behera et al., 2011)
Espanha	6,17	2,02	(Santos et al., 2009)
Grécia	3,203	0,070	(Stamatis and Konstantinou, 2013)
Portugal	15	0,92	(Silva et al., 2014)

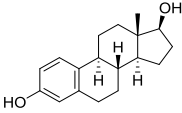
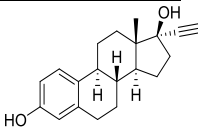
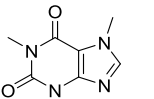
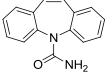
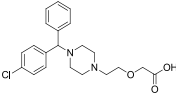
Tabela 7. Concentrações de CAF em águas superficiais.

Localização	CAF ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	Referência
Alemanha	3,3	(Bahlmann et al., 2012)
Grécia	0,052	(Stamatis and Konstantinou, 2013)
Portugal	<LDD-9	(Silva et al., 2014)

1.1.2. Vias e Destino

A poluição do ambiente aquático e os consequentes efeitos nocivos na população aquática fazem com que seja de extrema importância tentar prever o destino dos PPCPs e dos CDEs e a sua distribuição no ambiente (Lima, 2011). Nesse sentido, é essencial conhecer as propriedades físico-químicas dos contaminantes (Tabela 8), e também as condições ambientais locais, pois serão ferramentas muito úteis na previsão do destino destes poluentes (Lintelmann et al., 2003; Ying et al., 2002).

Tabela 8. Propriedades físico-químicas dos compostos em estudo.

Composto	Grupo	Mr (g mol^{-1})	pK _a	S _{água} (mg L^{-1})	Log K _{OA}	Estrutura
E2 ¹	Estrogénio natural	272,4	10,4	13,0	3,94	
EE2 ¹	Estrogénio sintético	296,4	10,4	4,8	4,15	
CAF ²	Alcaloide	194,2	10,4	2,16x10 ⁴	-0,07	
CBZ ²	Antiepilético	236,27	7	17,7	2,47	
CET ³	Anti-histamínico	388,9	pK _{a1} : 2,70 pK _{a2} : 3,57 pK _{a3} : 7,56	6,96x10 ⁴	1,70	

¹(Silva, 2014); ²(Stamatis e Konstantinou, 2013); ³PubChem, 2016.

Dos parâmetros físico-químicos destacam-se a solubilidade em água e o coeficiente de partição octanol/água (K_{OA}). A solubilidade em água depende fortemente da temperatura, do pH, da força iônica e da existência de matéria orgânica dissolvida (MOD) ou particulada (MOP). O coeficiente de partição descreve a partição de uma substância orgânica não polar entre a fase aquosa e a fase orgânica (octanol) (Lintelmann et al., 2003).

Quando os poluentes chegam ao ambiente aquático são sujeitos a diferentes processos de transporte, tais como: volatilização, lixiviação, escorrência, degradação e sorção/dessorção. O processo de lixiviação foi identificado como sendo a maior causa de contaminação de águas subterrâneas. Neste processo, os poluentes são transportados a partir do solo pela ação da percolação da água (Lima, 2011). Já o processo de degradação é o que contribui mais significativamente para a diminuição da concentração de poluentes no ambiente. A degradação dos poluentes inclui processos bióticos (biodegradação) e processos abióticos, tais como hidrólise, oxidação/redução e fotólise (Petrović e Barceló, 2007). Muitos dos compostos emergentes são constituídos por anéis aromáticos e grupos funcionais, podendo, eles próprios, absorver radiação solar, ou reagir com radicais formados no processo de fotodegradação. Assim, esta pode ser considerada como uma das formas mais eficazes de atenuar a presença destes poluentes no ambiente (Silva, 2014). O processo de sorção ocorre quando moléculas de poluentes se ligam a matéria particulada. Esta ligação pode ser completamente reversível ou totalmente irreversível e a interação pode ser física, através de forças de *van der Waals*, e/ou química, através de interações eletroestáticas, sendo que o tipo de interação não depende unicamente das propriedades dos poluentes mas também das propriedades das partículas adsorventes (Lima, 2011; Peuravuori e Pihlaja, 2009).

1.1.3. CDEs e PPCPs em Portugal

Portugal está localizado a sudoeste da Europa e apresenta uma vasta área costeira. É atravessado por vários rios, sendo que a maior parte deles segue de Este para Oeste, desaguando no Oceano Atlântico (Ribeiro et al., 2016) (Figura 2).

A maior parte da população portuguesa encontra-se fixada em áreas costeiras, principalmente, no Norte e Centro do país, onde também estão implementadas a maioria das atividades industriais, agrícolas e portuárias. Consequentemente, toda a área costeira

está sujeita a uma pressão antropogénica intensa causada por uma vasta gama de poluentes (CDEs e PPCPs) que ali são descarregados (Ribeiro et al., 2016).

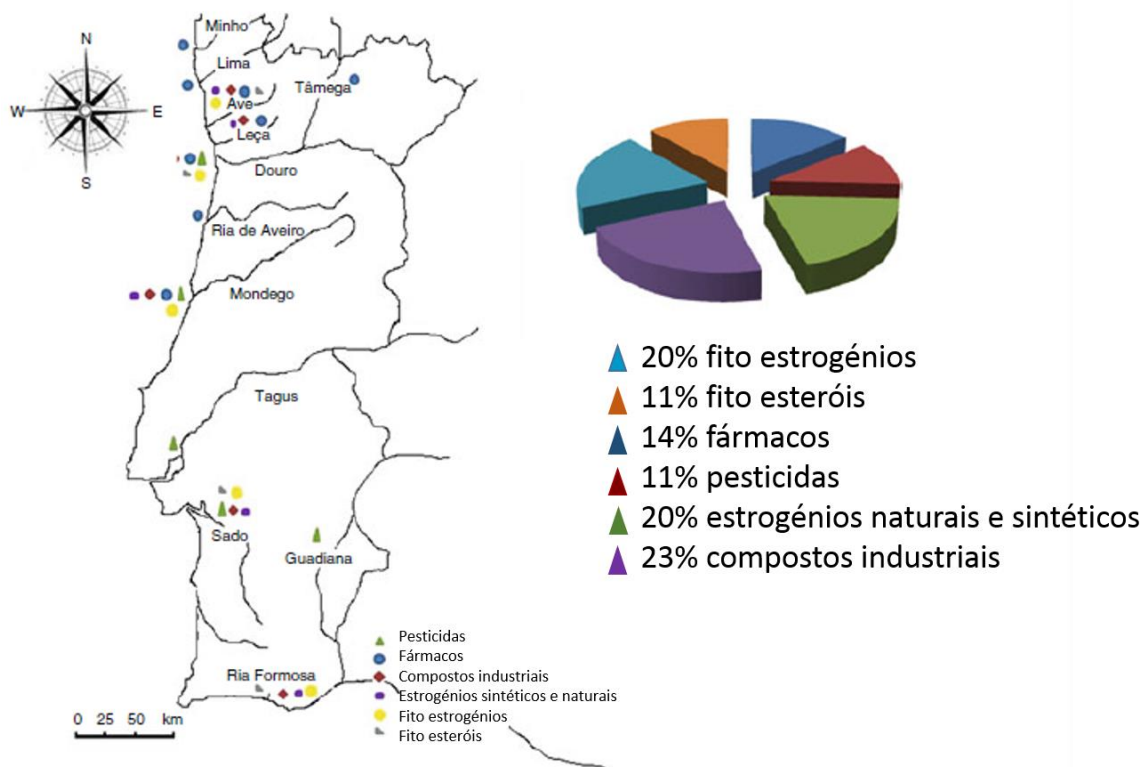


Figura 2. Distribuição espacial de CE em águas superficiais em Portugal (adaptado de Ribeiro et al., 2016).

Rocha et al. (2013) fizeram um estudo focado na ocorrência de vários CDEs, incluindo as hormonas E2 e EE2. Realizaram amostragens a cada dois meses, durante o ano de 2010, em nove locais distribuídos ao longo do Estuário do Sado, tendo sido as amostras, posteriormente, analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS). As hormonas foram detetadas em concentrações entre 1,2 e 11,6 ng L⁻¹, no caso do E2, e entre 1,1 e 3,1 ng L⁻¹, no caso do EE2. Na Tabela 9, apresentam-se alguns estudos que diversos autores realizaram em Portugal, a fim de ter uma perceção sobre as concentrações de hormonas (mais especificamente, E2 e EE2) em águas superficiais no nosso País.

Tabela 9. Estudos de quantificação de E2 e EE2 em Portugal.

Localização	Concentração (ng L ⁻¹)		Referência
	E2	EE2	
Estuário do Rio Mondego	<LDD	<LDD	(Ribeiro et al., 2009)
Estuário do Rio Sado	1,2-11,6	1,1-3,1	(Rocha et al., 2013b)
Estuário do Rio Douro	<LDD	>101,9	(Ribeiro et al., 2009)
Estuário do Rio Douro e Oceano Atlântico	6,3-14,4	<LDD-2,8	(Rocha et al., 2011)
Estuário do Rio Douro e Linha Costeira do Porto	5,2-5,7	1,0-1,3	(Rocha et al., 2012)
Rio Leça e Linha Costeira do Porto	3,3-5,9	2,1-4,4	(Rocha et al., 2012)
Rio Ave e Linha Costeira de Vila do Conde	1,6-9,4	0,3-20,4	(Rocha et al., 2013b)
Ria Formosa	1,2-10,1	12,1-25,0	(Rocha et al. 2013b)
ETARs de Aveiro	<LDD-9,2	<LDD	(Sousa et al., 2010)

Na Tabela 10 encontra-se uma compilação de estudos realizados em águas potáveis, superficiais e residuais, em praticamente toda a linha costeira de Portugal. Além disso, são também evidenciados os locais e o período de amostragem.

Analisando os resultados obtidos destes estudos, é possível verificar que os estrogénios E2 e EE2 são frequentemente detetados, tendo principal destaque no Rio Douro onde foram encontrados em maiores concentrações. A CET foi apenas quantificada na Ria de Aveiro por Calisto et al. (2011). De um modo geral, tanto em águas superficiais como em águas residuais, a CBZ é o fármaco mais detetado podendo ser considerado, como já foi referido anteriormente, um marcador de poluição antropogénica.

Tabela 10. Ocorrência de CDEs e PPCPs em águas portuguesas (adaptado de Ribeiro et al., 2016).

	Localização	Amostra	Período de Amostragem	Composto	Concentração (ng L ⁻¹)
Água potável	Lisboa	Sistema de abastecimento de águas EPAL	janeiro-dezembro 2013	CAF	>46
Águas superficiais	Rio Leça	Água doce	Não referido	E1	0,5-7,4
				E2	n.d.-13,4
				EE2	n.d.-2,8
	Rio Ave	Água doce e da linha costeira	janeiro–novembro 2010	E1	1,4-4,1
				E2	1,6-5,9
				EE2	0,5-20,4
	Rio Douro	Água estuarina	dezembro 2005 – outubro 2006	E1	99,8-112,5
				EE2	56,0-101,9
			outubro 2007 – julho 2008	CBZ	0,37-178,0
				E1	0,52-1,96
			março 2009	E2	6,25-14,36
				EE2	0,58-2,76
				E1	1,5-4,6
			novembro 2009 – setembro 2010	E2	5,4-8,5
				EE2	<LDQ-4,5
	Ria de Aveiro	Água estuarina	Não referido	CBZ	n.d-110
				CET	n.d-40
	Rio Sado	Água estuarina	julho-dezembro 2006	E1	<LDQ
				E2	<LDQ
				EE2	<LDQ
			fevereiro-dezembro 2010	E1	1,2-9,7
				E2	7,2-10,8
				EE2	1,1-2,8
	Ria Formosa	Água estuarina	fevereiro-dezembro 2010	E1	0,9-2,0
				E2	4,7-10,1
				EE2	14,4-25,0
ETARs	Porto	Efluente	março 2011	CBZ	417
	Aveiro	Água residual	abril-maio 2010	CBZ	n.d-650
				CET	n.d-600
	Lisboa e Vale do Tejo	Influentes e efluentes provenientes de 5 ETARs	primavera (maio-julho) e outono (outubro) 2010	CAF	n.d-36160
				CBZ	n.d-994
				E1	n.d-2484
				E2	n.d-344
				EE2	n.d-106

1.1.4. Métodos analíticos para a quantificação de CDEs e PPCPs em matrizes ambientais aquáticas

A quantificação dos CDEs constitui um desafio devido à presença destes compostos em concentrações muito baixas no ambiente e pelo facto de estarem presentes em matrizes ambientais complexas. Sendo que a maior parte dos instrumentos analíticos não é capaz de detetar diretamente concentrações tão baixas, é, muitas vezes, necessário recorrer-se a métodos de pré-concentração. Estes métodos podem, no entanto, revelar-se prejudiciais, em alguns casos, pois envolvem uma série de passos que poderão afetar a análise quantitativa.

Uma vez que os CDEs apresentam uma vasta gama de características físico-químicas, cada composto requer uma análise específica usando diferentes técnicas analíticas (Bolong et al., 2009). Por exemplo, no caso dos antibióticos, a cromatografia gasosa não é uma técnica apropriada pois estes compostos são muito polares e não voláteis, sendo a cromatografia líquida a técnica mais usada (Silva, 2014).

As técnicas cromatográficas, GC-MS, GC-MS/MS, cromatografia líquida acoplada ao detetor de díodos de *array* (LC-DAD), LC-DAD-MS, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), LC-MS/MS, LC-MS/MS com ionização electrospray (ESI), e a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a MS/MS (UHPLC-MS/MS), são as técnicas mais utilizadas na quantificação e deteção dos CEs, pois destacam-se pela sua elevada sensibilidade e seletividade (Silva et al., 2013).

As técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massa apresentam, no entanto, algumas desvantagens, tais como: elevados custos ao nível de equipamentos e manutenção e exigência de técnicos especializados. As técnicas cromatográficas associadas a detetores de ultravioleta visível (UV-Vis) e fluorescência são técnicas mais acessíveis, não sendo necessários técnicos especializados; no entanto, envolvem processos morosos de tratamento e pré-concentração da amostra. Portanto, um dos principais desafios na monitorização de CDEs e PPCPs em amostras de água é a implementação de métodos analíticos sensíveis, simples e de baixo custo (Silva, 2014).

Surgem assim os ensaios imunoenzimáticos (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) como alternativa às técnicas anteriormente mencionadas. Estes ensaios baseiam-se na seletividade e na afinidade de um anticorpo (Ab), pelo seu antigénio. Esta técnica apresenta elevada especificidade, tempo de análise reduzido, baixo

custo, possibilidade de analisar várias amostras em simultâneo e limites de deteção baixos (Lima et al., 2014). Os ensaios ELISA, técnica que será abordada com mais detalhe no capítulo seguinte, apresentam ainda a vantagem de poderem ser aplicados sem se fazer previamente qualquer pré-tratamento da amostra (Silva, 2014).

1.2. Imunoensaios

Originalmente, os métodos imunológicos foram aplicados em medicina para fins de diagnóstico, uma vez que são métodos com elevada sensibilidade e seletividade (Van Emon, 2001). Na década de 50, Yalow e Berson (1959) apresentaram, pela primeira vez, um ensaio imunológico para detetar insulina humana e, posteriormente, desenvolveram os radioimunoensaios (RIA, do inglês *Radioimmunoassay*), técnica muito usada atualmente. Estes ensaios imunológicos têm sido aplicados em diversas áreas, tais como medicina veterinária, agricultura e análises ambientais e alimentares (Franek e Hruska, 2005). No entanto, nesta técnica usam-se antigénios ou Abs marcados radioativamente, o que representa uma desvantagem já que os radioisótopos são conhecidos por serem perigosos, caros e por terem processos de monitorização e eliminação inconvenientes (Mikkelsen e Cortón, 2004). Uma boa alternativa seria utilizar Abs ou antigénios não marcados radioativamente. Em 1971, surgiu a primeira publicação científica sobre ensaios imunoenzimáticos: Engvall e Perlmann (1971) quantificaram a imunoglobulina G (IgG), em soro de coelho, usando como marcador a fosfatase alcalina. Poucos anos mais tarde, os ensaios ELISA começaram a ter expressão em química ambiental, tendo sido desenvolvido, em 1975, o primeiro ensaio para pesticidas, por Langone e Vanvunakis (1975).

No que concerne à monitorização ambiental de fármacos, são necessárias metodologias eficientes para detetar níveis de concentração vestigiais. Os métodos imunológicos oferecem simplicidade, sensibilidade e seletividade, o que faz deles, métodos confiáveis para a quantificação deste tipo de contaminantes (Van Emon, 2001).

1.2.1. Anticorpos

Os métodos imunológicos envolvem o uso de Abs, os quais são produzidos como uma resposta imunitária a um imunogénio (composto capaz de induzir uma resposta imunológica). Os Abs são caracterizados por terem locais de reconhecimento nas suas estruturas que permitem interações altamente específicas com antigénios. Os antigénios, por sua vez, apesar de serem capazes de se ligarem seletivamente aos Abs, não produzem necessariamente uma resposta imunológica (Mikkelsen e Cortón, 2004).

1.2.1.1. Propriedades estruturais e funcionais

Os Abs são macromoléculas em forma de Y (Figura 3) que pertencem a uma família de glicoproteínas estruturalmente relacionadas, denominadas imunoglobulinas (Ig), presentes no soro sanguíneo de todos os mamíferos. Existem cinco classes de Ig conhecidas, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, que diferem entre si em tamanho, carga, composição de aminoácidos e conteúdo em hidratos de carbono. As Ig apresentam, no entanto, características estruturais comuns que lhes permitem o reconhecimento e a ligação específica a uma única unidade estrutural num antígeno (epítopo) e a realização de uma função biológica depois de se combinar com o antígeno (Mikkelsen e Cortón, 2004).

Os Abs possuem duas cadeias polipeptídicas leves iguais (25 kDa) e duas pesadas também de igual tamanho (50 kDa). As cadeias pesadas encontram-se ligadas entre si por pontes dissulfureto (S-S) e às cadeias leves por pontes S-S e ligações não covalentes. A zona amino-terminal das cadeias leves localiza-se no topo da estrutura Y, nos chamados fragmentos F_{ab} (fragmento de ligação ao antígeno). A sequência de aminoácidos destas extremidades amino-terminais determina as propriedades específicas de ligação ao antígeno. A sequência das cadeias pesadas, nos chamados fragmentos F_c (fragmentos cristalizáveis), determina a classe do Ab (Lima, 2011; Mikkelsen e Cortón, 2004).

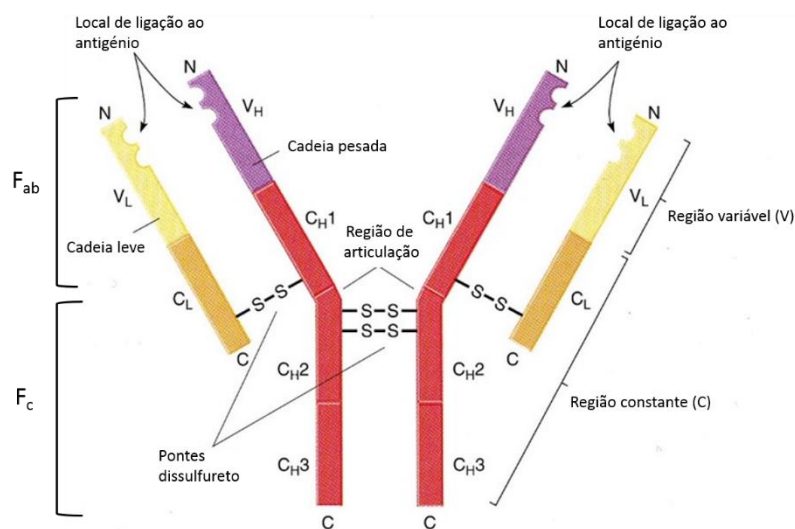


Figura 3. Estrutura básica de um Ab (IgG) (adaptado de Holliger e Hudson, 2005).

A seletividade das interações antígeno-Ab é análoga à seletividade das interações enzima-substrato (mais conhecidas como interações chave-fechadura). O local de ligação

do Ab ao antígeno tem uma estrutura que permite o reconhecimento específico de elementos estruturais e grupos funcionais do antígeno. Esta parte do antígeno é altamente específica e chama-se, como referido anteriormente, epítipo. Por fim, a ligação antígeno-Ab envolve interações eletrostáticas, hidrofóbicas, de *van der Waals* e ligações por pontes de hidrogénio (Mikkelsen e Cortón, 2004; Silva, 2014).

1.2.1.2. Síntese de Abs

As proteínas com peso molecular elevado são capazes de provocar uma resposta imunológica de forma natural. No caso dos compostos com baixo peso molecular, tal já não se verifica pois, apesar de poderem ser antígenicos, estes compostos não são capazes de induzir a produção de Abs. Nesta situação é necessário sintetizar em laboratório uma molécula (designada por hapteno) que mimetize todos os aspetos químicos e físicos do composto em questão. O hapteno deve ser conjugado com uma molécula precursora, tal como uma proteína ou um polímero para formar um imunogénio (Lima, 2011).

Os Abs podem ser monoclonais ou policlonais, dependendo do método usado na sua preparação.

Os Abs policlonais são os mais utilizados em técnicas imunológicas e são isolados diretamente do soro sanguíneo. O antissoro irá conter diferentes populações de Abs com diferentes níveis de seletividade para o imunogénio. Desta forma, pode afirmar-se que o soro é uma boa fonte de Abs policlonais pois contém uma mistura de Abs que se ligam aos diferentes epítipos do hapteno conjugado, bem como Abs gerados para responder a outros imunogénios presentes no organismo do animal. A capacidade destes Abs para reconhecerem epítipos múltiplos significa que podem reagir de forma cruzada com outras proteínas, mas também podem possuir a capacidade de reconhecer as proteínas no seu estado nativo e desnaturado (Cunningham, 2014).

Os Abs monoclonais são uma população homogénea de moléculas semelhantes de Abs que têm afinidade para um único epítipo do antígeno. Os Abs monoclonais são produzidos através da combinação de células produtoras de Abs do baço, com células tumorais provenientes de mielomas (Figura 4). A hibridização das células somáticas permite a fusão entre a célula do mieloma e a célula produtora de Abs do baço a partir do animal imunizado (Mikkelsen e Cortón, 2004; Van Emon, 2001).

Os Abs policlonais são mais fáceis de obter do que os Abs monoclonais, uma vez que a produção dos últimos requer um investimento inicial elevado. É por esta razão que os

Abs policlonais são os mais utilizados em técnicas imunológicas (Franek e Hruska, 2005). No entanto, podem apresentar variações de lote para lote, causando problemas com reprodutibilidade, enquanto os monoclonais são reprodutíveis e altamente específicos, pois ligam-se a um único epítipo e, portanto, apresentam baixa reatividade cruzada com outras estruturas (Cunningham, 2014).

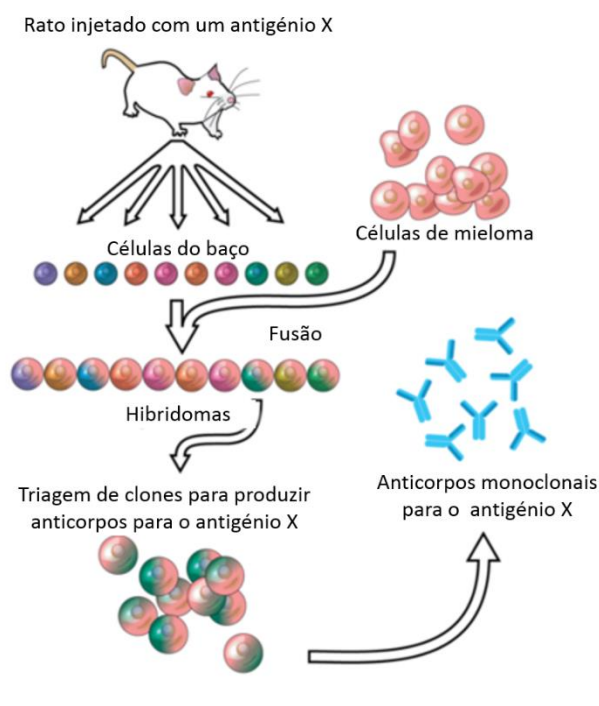


Figura 4. Preparação de Abs monoclonais (adaptado de Mikkelsen e Cortón, 2004).

1.2.2. Ensaios Imunoenzimáticos (ELISA)

Os imunoensaios existem num vasto número de formatos. Os imunoensaios enzimáticos são um grupo de metodologias que usam enzimas como marcadores (aptas para se ligarem ao antígeno ou ao Ab) que quando conjugadas com um substrato constituem a base da produção de um sinal analítico. A fosfatase alcalina e a peroxidase de rábano são os marcadores enzimáticos (designados também por *tracers*) mais utilizados (Law, 2005; Nunes, 2005).

Os imunoensaios enzimáticos podem ser classificados como competitivos ou não competitivos (havendo ou não competição entre o antígeno e o *tracer* (T) por um número limitado de locais de ligação do Ab) ou como heterogéneos ou homogéneos (nos heterogéneos é necessária uma separação entre o Ab ligado e o não ligado, sendo o não

ligado eliminado através de lavagens, enquanto que nos homogêneos este passo de separação não é necessário) (Petrović e Barceló, 2007).

Os imunoenaios homogêneos dependem das espécies de antígeno marcado que, ao se ligarem aos Abs, exibem grandes alterações de sinal, daí não ser necessária a separação entre as frações ligadas e não ligadas. Estes imunoenaios dependem muito da matriz porque a cor e a turbidez das amostras interferem com o sinal do ensaio. Os marcadores mais utilizados neste tipo de imunoensaio são os fluoróforos e as enzimas (Mikkelsen e Cortón, 2004; Van Emon, 2001).

Os imunoenaios enzimáticos heterogêneos mais conhecidos e mais frequentemente usados são os ensaios ELISA. Este método, muito utilizado em análises ambientais e que pode ser competitivo ou não competitivo, faz uso de um dos componentes (antígeno ou Ab) ligado a um suporte sólido (Law, 2005).

No método ELISA não competitivo (Figura 5), o Ab imobilizado é colocado em excesso e liga-se quantitativamente ao antígeno. Em seguida, um segundo Ab, marcado com enzima é adicionado e interage com o antígeno ligado, formando uma espécie de sanduíche que é detetada pela medição da atividade da enzima ligada à superfície do suporte sólido. Neste tipo de imunoensaio as curvas de calibração obtidas mostram que a atividade enzimática aumenta com o aumento da concentração do antígeno livre. Este método não é apropriado para moléculas muito pequenas, sendo apenas aplicável quando o analito em estudo tem pelo menos dois locais de ligação (Hennion e Barceló, 1998; Mikkelsen e Cortón, 2004).

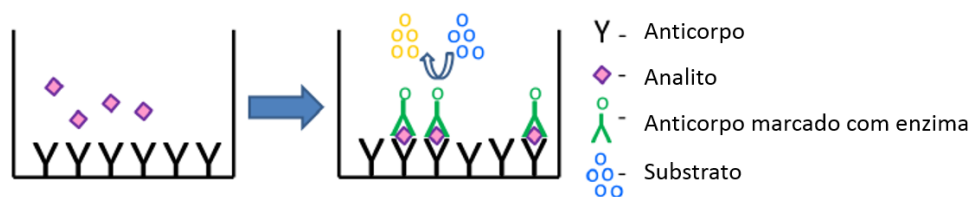


Figura 5. Método ELISA não competitivo (adaptado de Lima, 2011).

O método ELISA competitivo pode ser direto ou indireto (Van Emon, 2001). Na Figura 6, está representado o método ELISA competitivo direto. Neste caso, o antígeno e uma quantidade de T conhecida competem diretamente pelos locais de ligação do Ab, imobilizado num suporte sólido. Depois da remoção dos reagentes não ligados ao Ab, a adição de um substrato irá promover uma reação colorimétrica catalisada pela enzima, o

que dará origem à cor azul da solução. A reação é terminada pela adição de um reagente ($1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$), o que origina a cor amarela. Como resultado obtém-se um sinal, a densidade ótica (DO), que é proporcional à quantidade de *T* ligado ao Ab e inversamente proporcional à quantidade de antígeno (analito) presente nas amostras/padrões em análise (Petrović e Barceló, 2007; Van Emon, 2001).

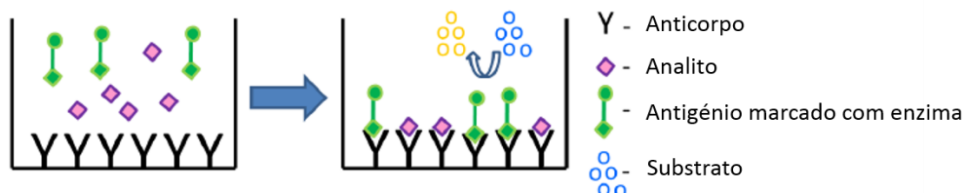


Figura 6. Método ELISA competitivo direto (adaptado de Lima, 2011).

No método competitivo indireto, representado na Figura 7, é o antígeno que é imobilizado no suporte sólido. Em seguida, liga-se o Ab ao antígeno e por fim um segundo Ab devidamente marcado com a enzima. Neste tipo de imunoensaio, o analito presente na amostra é quantificado indiretamente através da medição do Ab ligado ao segundo Ab. Neste método, tal como no método competitivo direto, o sinal medido é inversamente proporcional à quantidade de analito presente na amostra. (Petrović e Barceló, 2007).

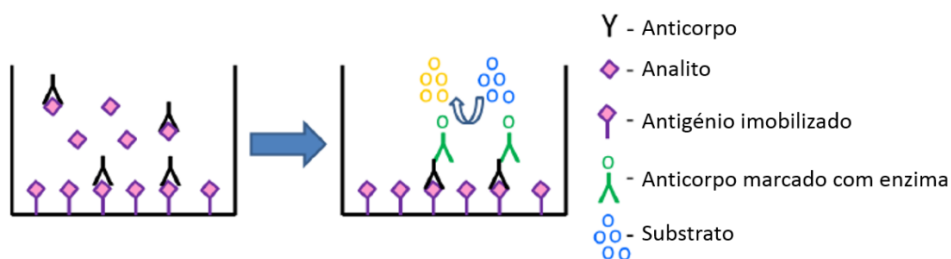


Figura 7. Método ELISA competitivo indireto (adaptado de Lima, 2011).

1.2.2.1. Curva de calibração em ELISA

Em ELISA, a relação entre a concentração de analito e a DO é representada numa curva designada por curva dose-resposta (Figura 8), a qual apresenta uma forma sigmoidal com uma região central linear.

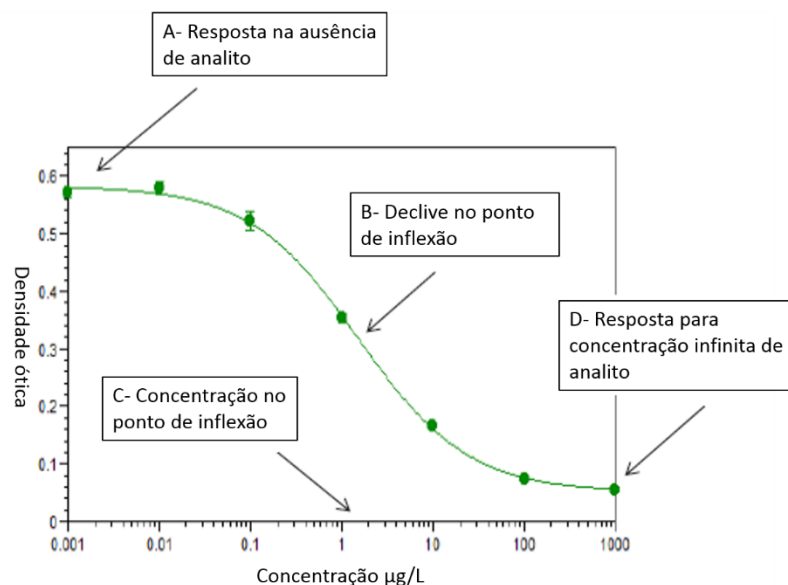


Figura 8. Curva de calibração típica em ELISA (adaptado de Silva, 2014).

As curvas de calibração são obtidas usando vários padrões de antígeno (analito) com diferentes concentrações. Os valores experimentais são ajustados a uma equação de quatro parâmetros logarítmicos (4PL) obtidos mediante regressão não-linear definida pela seguinte equação (Dudley et al., 1985):

$$y = \left[\frac{A-D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} \right] + D \quad (\text{Eq.2.1})$$

onde y é a DO; x , a concentração de antígeno; A , a assíntota máxima correspondente à DO na ausência de antígeno, A_0 ; B , o declive da curva no ponto de inflexão; C , o valor de x no ponto de inflexão e D , a assíntota mínima correspondente à DO quando o antígeno está em excesso, A_{excesso} . Na maioria das representações gráficas observa-se a variação da DO em função do logaritmo da concentração, mas, para facilitar a comparação entre diferentes curvas, é mais favorável utilizar a variação da DO normalizada entre A (A_0) e D (A_{excesso}), $\%B/B_0$, de acordo com a seguinte equação (Schneider et al., 2005):

$$\%B/B_0 = \frac{(DO-D)}{(A-D)} \times 100 \quad (\text{Eq.2.2})$$

Da curva dose-resposta é ainda possível retirar outras informações de extrema importância como é o caso da sensibilidade do imunoensaio, podendo fazer-se uma avaliação prévia da mesma através do parâmetro C da curva 4PL. A sensibilidade pode ser expressa pelo limite de detecção (LDD), geralmente considerado como a concentração mais baixa de analito que produz um sinal diferente do sinal do branco. Apesar de não existir

uma regra padrão para o cálculo deste valor, há um consenso em selecionar a quantidade que inibe 10% do marcador enzimático ligado ao Ab, ou seja, o valor correspondente a 90% de B/B₀ da equação 2.2. Muitas vezes o LDD não está na região linear da curva e, assim sendo, é usado o limite de quantificação (LDQ), definido pelos limites superior e inferior da região linear da curva dose-resposta (Hennion e Barceló, 1998).

1.2.2.2. Reatividade Cruzada

A reatividade cruzada (RC) é um indicador da especificidade do ensaio, medindo a resposta do Ab a outras substâncias que não o analito. A RC tem, assim, uma importância fundamental no desenvolvimento de um imunoenensaio. É determinada para um dado analito na presença de espécies estruturalmente semelhantes, sendo calculada como a razão das concentrações molares nos pontos de inflexão das respectivas curvas de calibração (mais precisamente nos pontos médios, ou seja, usando o parâmetro C das curvas) (Schneider et al., 2005):

$$RC = \frac{C_{\text{analito}}}{C_{\text{teste}}} \times 100 \quad (\text{Eq.2.3})$$

onde RC é a reatividade cruzada; C_{analito} é o parâmetro da 4PL que dá a concentração de analito no ponto de inflexão e C_{teste} é a concentração do composto estruturalmente relacionado com o analito no seu ponto de inflexão (Schneider et al., 2005).

1.2.3. Técnicas de pré-concentração acopladas a ELISA

Uma vez que os fármacos e compostos disruptores endócrinos estão presentes nos ambientes aquáticos, ou seja, em matrizes complexas, em níveis de concentração muito baixos, pode ser necessário usar metodologias de pré-concentração antes da sua quantificação por ELISA, não só com o objetivo de aumentar a sua concentração, mas também como forma de “limpar” a amostra antes da análise.

1.2.3.1. Extração em Fase Sólida

A técnica de extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é das técnicas mais utilizadas na preparação de amostras, tendo várias aplicações, nomeadamente, na análise de fármacos e de alimentos. Vários autores referem a técnica de

SPE como o passo de pré-concentração de eleição em ELISA (Shishida et al., 2000; Suzuki e Maruyama, 2006; Swart e Pool, 2007).

Huang e Sedlack (2001) desenvolveram um procedimento de SPE, como método de pré-concentração seguido por ELISA, para a determinação de E2 e EE2 em efluentes secundários de águas residuais e em águas superficiais, conseguindo quantificar níveis de concentração entre 0,2 e 4,1 ng L⁻¹. Os autores compararam os resultados obtidos através de GC-MS/MS com os resultados obtidos através de ELISA e concluíram que, por ELISA, era possível a obtenção de LDD mais baixos. Além disso, verificaram que por ELISA os fatores de concentração requeridos eram mais baixos e ainda que esta técnica se mostrou menos suscetível a interferências por parte da matriz (Huang e Sedlak, 2001).

Dorabawila e Gupta (2005) analisaram a presença de E2 em amostras de águas provenientes de lagoas, rios, baías costeiras e ETARs. Neste estudo, as amostras foram pré-concentradas através de SPE e, em seguida, analisadas por ELISA: os valores de concentração de E2 obtidos encontraram-se entre 1,9 e 6,0 ng L⁻¹ e o LDD foi 0,5 ng L⁻¹.

Apesar de amplamente utilizada, esta técnica de pré-concentração é morosa, implica o consumo elevado de solventes orgânicos e de cartuchos de elevado custo e requer volumes elevados de amostra (Lima et al., 2014). Como alternativa, existe a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*), sendo que esta técnica apresenta diversas vantagens em relação à SPE, tais como, simplicidade, baixo custo, fatores de recuperação e de enriquecimento elevados e também a possibilidade de extrair varias amostras em simultâneo (Du et al., 2010; Lima et al., 2014; Rezaee et al., 2006).

1.2.3.2. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva

A técnica de DLLME foi primeiramente enunciada por Rezaee et al. (2006) para determinação de compostos orgânicos em matrizes aquosas. É uma técnica de microextração e pré-concentração de amostras baseada num sistema ternário de solventes, que utiliza um solvente dispersivo (miscível na fase orgânica e na fase aquosa) e um solvente extrator (imiscível na fase aquosa). A DLLME compreende duas etapas devidamente esquematizadas na Figura 9.

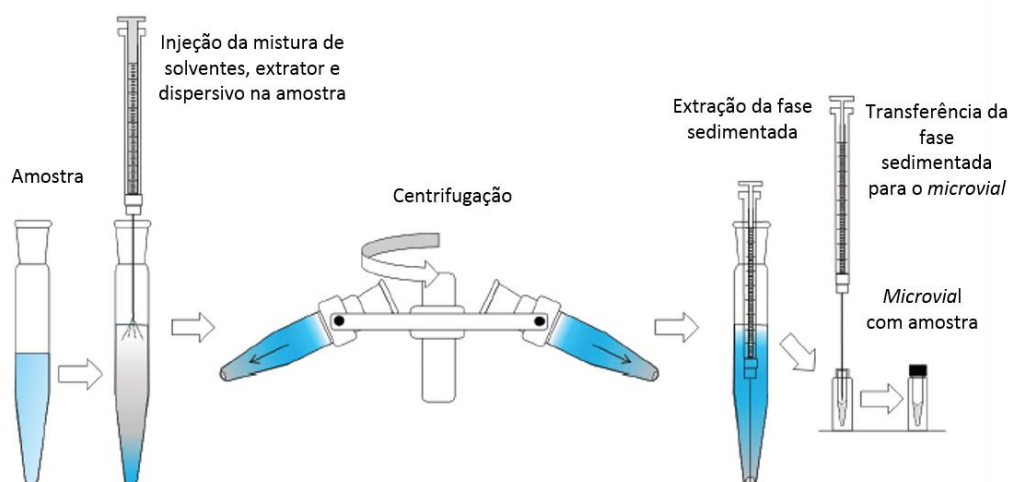


Figura 9. Procedimento de DLLME (adaptado de Martins et al., 2012).

Na primeira etapa, é injetada uma mistura de solventes, extrator e dispersivo, na amostra aquosa que contém o analito. O solvente extrator dispersa-se na fase aquosa sob a forma de gotas muito finas formando-se uma solução turva, sendo este processo auxiliado pelo solvente dispersivo. Nesta técnica atinge-se o equilíbrio rapidamente devido à grande área superficial existente entre o solvente extrator e a amostra (fase aquosa), logo, a extração é praticamente instantânea. Numa segunda etapa, procede-se à centrifugação da solução turva e à remoção da fase sedimentada, (se o solvente extrator for mais denso que a fase aquosa) (Martins et al., 2012; Rezaee et al., 2006).

A extração dos analitos é feita com base na polaridade relativa do sistema, sendo que estes, normalmente, são apolares ou pouco polares e por isso tem maior afinidade para o solvente extrator, também apolar ou pouco polar (Martins et al., 2012).

1.2.3.2.1. Fatores a otimizar

A eficiência da extração é influenciada pelo tipo de solventes (extrator e dispersivo) e também pelo seu volume (Martins et al., 2012; Rezaee et al., 2006).

O solvente extrator deve ser escolhido com base na sua densidade, que deverá ser superior à da água, e na capacidade de extração dos analitos em questão. Os solventes mais recorrentes são os hidrocarbonetos halogenados, tais como o clorobenzeno, tetracloreto de carbono, o clorofórmio e o tetracloroetileno, devido à sua elevada densidade e baixa solubilidade em água. O solvente dispersivo deve ser miscível em ambas as fases (aquosa e orgânica) e, por isso, os mais utilizados são a acetona, o acetonitrilo e o metanol (Martins et al., 2012).

Para além do volume de amostra, o volume de solvente extrator determina o fator de pré-concentração da DLLME, porque está diretamente ligado ao volume de fase sedimentada. Logo, o volume de solvente extrator escolhido deve garantir um elevado fator de pré-concentração e um volume de fase sedimentada suficiente para as análises pretendidas. O volume de solvente dispersivo depende do volume de solvente extrator usado, portanto, é necessário alterar simultaneamente ambos os volumes de forma a manter o volume da fase sedimentada constante (Martins et al., 2012; Rezaee et al., 2006).

A força iónica e o pH são parâmetros que também devem ser tidos em conta pois têm influência na separação das fases e no estado de ionização do analito. No que diz respeito à força iónica, por exemplo, o aumento da concentração de NaCl implica o aumento do volume da fase sedimentada; no entanto, esta influência dependerá de cada analito. Já o pH deverá ser otimizado em função da acidez ou basicidade do analito, pois o ajuste do pH do meio irá permitir que o analito permaneça na forma neutra (Martins et al., 2012).

O tempo de extração é definido como o intervalo de tempo entre a injeção da mistura de solventes e o final da centrifugação. O equilíbrio de partição dos analitos entre a fase orgânica e a fase aquosa é atingido muito rapidamente, no entanto, este parâmetro deve ser otimizado, pois é um dos parâmetros mais importantes em técnicas de microextração. O facto de este equilíbrio ser atingido muito rapidamente permite que o tempo de extração seja muito curto (na ordem dos seg) sendo esta uma das maiores vantagens da DLLME (Martins et al., 2012).

Du et al. (2010) recorreram à DLLME como método de extração e pré-concentração das hormonas E1 e E2 em amostras de águas. Os autores otimizaram os diferentes parâmetros da técnica de DLLME, tais como, tipo e volume de solventes extrator e dispersivo, tempo de extração e força iónica. Uma vez otimizados estes parâmetros, os fatores de enriquecimento e os LDD foram 347 e 0,2 ng L⁻¹, respetivamente, para o E1, e 203 e 0,1 ng L⁻¹, respetivamente, para o E2.

Os autores fizeram, ainda, a comparação entre a DLLME e outros métodos de pré-concentração, para posterior quantificação por cromatografia líquida acoplada ao detetor de ultravioleta visível (LC-UV), e verificaram que esta técnica de extração se apresenta vantajosa na análise de E1 e E2 em amostras de águas. Na Tabela 11, é evidenciado o

potencial desta técnica, visto que apresenta, de uma forma geral, melhores resultados para os parâmetros analisados quando comparada com os outros métodos de extração.

Tabela 11. Comparação da DLLME com outros métodos de pré-concentração para a determinação da E1 e do E2, por LC-UV, em amostras de águas (adaptado de Du et al., 2010).

Parâmetros	Compostos	Métodos		
		CPE-LC-UV	SPME-LC-UV	DLLME-LC-UV
% Recuperação	E1	98,0	NA	89,7-94,1
	E2	81,2-99,0	NA	84,6-111,2
RSD (%)	E1	8,1	6	3,8
	E2	12,0	16	1,8
LDD (ng mL ⁻¹)	E1	0,3	0,7	0,2
	E2	0,3	0,3	0,1
LR (ng L ⁻¹)	E1	1,0-192	2,0-50,0	0,5-5,000
	E2	1,0-90,0	1,0-50,0	0,5-5,000
Tempo de extração (min)	E1	60,0	45	seg.
	E2	60,0	45	seg.
Volume de amostra (mL)	E1	10,0	3,5	5
	E2	10,0	3,5	5
Volume extrator (μL)	E1	0,25% (w/v)	NA	25
	E2	0,25% (w/v)	NA	25
Volume de injeção (μL)	E1	20,0	NA	10
	E2	20,0	NA	10
NA – Não Avaliado; RSD – Desvio Padrão Relativo (do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>); LR – Intervalo linear (do inglês <i>Linear Range</i>); CPE-LC-UV – Extração em ponto de nuvem (do inglês <i>Cloud Point Extraction</i>) com cromatografia líquida acoplada ao detetor de Ultravioleta. DLLME-LC-UV – Microextração líquido-líquido dispersiva com cromatografia líquida acoplada ao detetor de Ultravioleta. SPME-LC-UV – Microextração em fase sólida com cromatografia líquida acoplada ao detetor de Ultravioleta.				

Lima et al. (2014) desenvolveram a técnica de DLLME para a posterior quantificação de estrogénios (E2 e EE2) por ELISA. Inicialmente, os autores verificaram que esta técnica de extração influenciava as curvas de calibração do E2 e do EE2 e, por isso, submeteram tanto as amostras como todos os padrões ao mesmo procedimento de DLLME. Verificaram também que a matéria orgânica não tinha influência no processo de extração e na quantificação das hormonas em estudo. Neste estudo a gama de trabalho obtida para o E2 foi entre 1,2 e 8000 ng L⁻¹ e para o EE2 entre 0,22 e 1500 ng L⁻¹. Na Tabela 12 são apresentadas as concentrações de E2 e de EE2 em diferentes amostras de águas pré-concentradas por DLLME e analisadas por ELISA.

Tabela 12. Determinação de E2 e EE2 em águas provenientes de fontes públicas (água potável), águas superficiais e residuais sujeitas a DLLME e analisadas por ELISA (adaptado de Lima et al., 2014).

Amostras	Concentração (ng L ⁻¹)	
	E2	EE2
Fontes de água potável	<LDD	<LDD
	<LDD	<LDD
	<LDD	<LDD
	1,2 ± 0,1	1,32 ± 0,8
	<LDD	0,37 ± 0,05
	<LDD	0,5 ± 0,4
	<LDD	<LDD
Águas superficiais	<LDD	0,4 ± 0,2
	4 ± 1	<LDD
	<LDD	<LDD
	34 ± 11	2,4 ± 1,1
	<LDD	<LDD
	17,8 ± 0,9	<LDD
	8 ± 2	24 ± 6
	<LDD	5 ± 2
	30 ± 1	16 ± 3
	<LDD	0,8 ± 0,2
	33,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Águas residuais	77 ± 33	6 ± 1
	21 ± 19	8,5 ± 0,6

Das amostras de água potável, só foi possível quantificar o E2 numa amostra enquanto o EE2 foi quantificado em três amostras. Já em amostras superficiais o E2 foi encontrado em concentrações mais elevadas do que o EE2, o que já era esperado pelos autores, uma vez que o E2 é uma hormona natural. Por fim, no que diz respeito às amostras provenientes de ETARs, o E2 foi sempre quantificado com concentrações mais elevadas que o EE2. Além disso, Lima et al. (2014), verificaram que todos os valores obtidos estavam de acordo com os valores geralmente obtidos na literatura o que vem confirmar a aplicabilidade do método desenvolvido

1.3. Objetivo da Tese

Atualmente, os CDEs e os PPCPs são considerados importantes contaminantes ambientais. Uma vez que as ETARs não estão preparadas para a remoção destes compostos das águas, a sua entrada no ambiente acontece ininterruptamente. As ETARs constituem, assim, a principal forma de entrada dos CDEs e PPCPs no ambiente.

O E2 e o EE2 são das hormonas que mais frequentemente se encontram em efluentes tratados de ETARs e, conseqüentemente, em águas superficiais nas quais esses efluentes são descartados. Uma vez que o E2 é uma hormona natural e o EE2 faz parte das pílulas anticoncepcionais, muito consumidas a nível mundial, a sua presença nos influentes e efluentes de ETARs será constante e, conseqüentemente, estes compostos estarão sempre presentes no ambiente. O estudo destes compostos é particularmente importante uma vez que, pela sua ação de disrupção endócrina, representam sérios riscos para a população aquática e, possivelmente, para a saúde humana. A importância atribuída a estes compostos (E2 e EE2) e à sua presença no ambiente aquático é realçada pelo facto de se encontrarem atualmente numa lista de vigilância elaborada pela União Europeia.

A CBZ é detetada com maior frequência no ambiente aquático, com vários estudos a reportar a sua ocorrência a nível global. A CBZ pode ser considerada um marcador antropogénico, ajudando no reconhecimento deste tipo de fonte de poluição. Além disso, sabe-se ainda que a CBZ é bastante resistente quer à biodegradação quer à fotodegradação, fator que favorece a sua presença constante no ambiente (Calisto et al., 2011). Vários estudos apontam a CET como o anti-histamínico mais frequentemente detetado no ambiente aquático, o que não é surpreendente já que é um dos fármacos com maior percentagem de embalagens vendidas anualmente. Outro fator que contribui para a presença deste fármaco no ambiente aquático é o facto de ser fracamente metabolizado no organismo, apresentando uma taxa de excreção de aproximadamente 80%.

A CAF é a substância mais consumida a nível global e é relativamente estável sob condições ambientais variáveis. É considerada como um marcador de poluição antropogénica, ajudando a estabelecer um perfil de poluição de origem humana quando encontrada em águas superficiais.

Esta dissertação teve como principal objetivo a monitorização de compostos emergentes, tais como EE2, E2, CBZ, CET e CAF, em amostras aquosas de diferentes

matrizes, procedendo-se, assim, à avaliação do ambiente aquático numa zona particular da região centro de Portugal. Foram recolhidas amostras de águas ao longo do ano a fim de se fazer uma avaliação sazonal, e em diferentes locais para uma avaliação espacial. A escolha dos locais de amostragem foi feita tentando abranger zonas diversificadas no que se refere à industrialização, densidade populacional, agricultura e presença ou ausência de animais, dado que são fatores que afetam a presença dos compostos em causa no ambiente aquático.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

2.2. Soluções e Reagentes

2.3. Amostras de águas

2.4. Aplicação da DLLME para posterior quantificação de E2 e EE2 por ELISA

2.4.1. Procedimento DLLME

2.4.2. Procedimento ELISA

2.5. Procedimento de ELISA para a CBZ

2.6. Procedimento de ELISA para a CET

2.7. Procedimento de ELISA para a CAF

2.1. Equipamentos

No que respeita aos ensaios ELISA, as microplacas de fundo plano, transparentes, de 96 poços, com alta capacidade de ligação aos Abs (MaxiSorp™) foram adquiridas na Nunc (ThermoScientific); os ciclos de lavagem foram realizados num lavador de placas automático de 8 canais (Atlantis, Asys Hitech); a agitação das mesmas foi feita num agitador Titramax 100, Heidolph; e a absorvância foi lida a 450 nm usando 620 nm como referência, num leitor de placas (UVM 340, Asys Hitech).

Os espectros de UV-visível foram obtidos, entre 200 e 600 nm, num espectrómetro Shimadzu UV 2101 PC, usando células de quartzo retangulares com 1 cm de percurso ótico.

O carbono orgânico total (DOC, do inglês *Total Organic Carbon*) foi medido usando o analisador DOC-VCPH da Shimadzu.

A salinidade das amostras foi medida usando um salinómetro MASTER REFRACTOMETER da ATAGO, enquanto o pH foi medido usando o Medidor Multi-parâmetros Edge® da HANNA.

2.2. Soluções e Reagentes

Todos os reagentes usados eram de grau analítico e foram utilizados como recebidos.

Todos os Abs e Ts foram fornecidos pelo Doutor Rudolf Schneider do BAM - “Federal Institute for Materials Research and Testing”, Berlim, Alemanha, à excepção do anti-rato IgG (R1256P, 217 mg mL⁻¹) que foi adquirido na “Acris Antibodies” (Aachen, Alemanha).

Os compostos estudados (EE2 ($\geq 98\%$), E2 ($\geq 97\%$), CBZ (99%), CET ($>98\%$) e CAF (puríssima)) foram adquiridos na Sigma.

Tetrametilbenzidina (TMB, puríssimo), hidreto de boro de tetrabutylamónio (TBABH, $>97\%$), dimetilacetamida (DMA), tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS, p.a.), albumina de soro bovino (BSA, para eletroforese, 98%), ácidos húmicos (AH) comerciais, e clorobenzeno (99,9%) foram, todos eles, adquiridos na Sigma. Fosfato de sódio dibásico di-hidratado ($>99\%$), fosfato de sódio monobásico di-hidratado ($>99\%$), sorbato de

potássio (>99%), citrato de potássio (>99%), peróxido de hidrogénio (30%), TweenTM 20 e ácido sulfúrico (95-97%) foram obtidos na Fluka. O sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético dihidratado (EDTA, p.a.) e o cloreto de sódio (99,5%) provieram da Panreac. A azida de sódio proveio da Riedel-de Haën. A Glicina (99,8%) foi fornecida pela VWR Prolabo.

A água ultrapura, usada na preparação de todas as soluções, foi obtida através de um sistema de purificação de água Millipore (Milli-Q plus 185).

Foram preparadas soluções-mãe individuais, em metanol, de E2, EE2, CBZ e CET com concentração 100 mg L⁻¹. Foi também preparada uma solução-mãe de CAF, em metanol, com concentração 1000 mg L⁻¹. Estas soluções-mãe foram devidamente diluídas, com água ultrapura, por forma a obter os padrões necessários à construção das curvas 4PL em ELISA. Foi, ainda, preparada uma solução-mãe de AH, com concentração 1 g L⁻¹, a pH 9 (na presença de 1 mol L⁻¹ hidróxido de amónio).

2.3. Locais de amostragem

As amostras de água foram recolhidas ao longo do rio Mondego começando no parque do Choupal em Coimbra e terminando no estuário da Figueira da Foz.

Foram feitas três amostragens em 3 estações do ano distintas, nas quais se recolheram 11 amostras, no entanto, na última amostragem, por questões de segurança, não foi possível recolher uma amostra correspondente à saída da ETAR no parque do Choupal.

As amostras recolhidas ao longo do rio Mondego são de água doce e as recolhidas na zona do estuário da Figueira da Foz já têm a contribuição do mar, sendo a última amostra recolhida já mesmo no mar. Algumas destas amostras encontram-se próximas de descargas de efluentes de ETARs, nomeadamente a ETAR do Choupal em Coimbra e a ETAR de Vila Verde na Figueira da Foz. A ETAR do Choupal serve cerca de 213 000 habitantes e a ETAR de Vila Verde cerca de 64 094 habitantes (Oliveira e Bravo, 2014). Nas Figuras 10 e 11 estão representados os locais onde as amostras foram recolhidas ao longo do rio Mondego.

As amostragens foram realizadas nas seguintes datas: outubro de 2015; fevereiro de 2016 e maio de 2016.



Figura 10. Localização dos locais de amostragem próximos do parque do Choupal, Coimbra.

Amostras de água doce recolhidas ao longo do rio Mondego em Coimbra:

- **Ponto 1:** Saída do efluente da ETAR do Choupal;
- **Ponto 2:** A 50 m da descarga;
- **Ponto 3:** A 500 m da descarga;
- **Ponto 4:** A 3000 m da descarga;
- **Ponto 5:** A 5000 m da descarga;
- **Ponto 6:** A 6500 m da descarga.

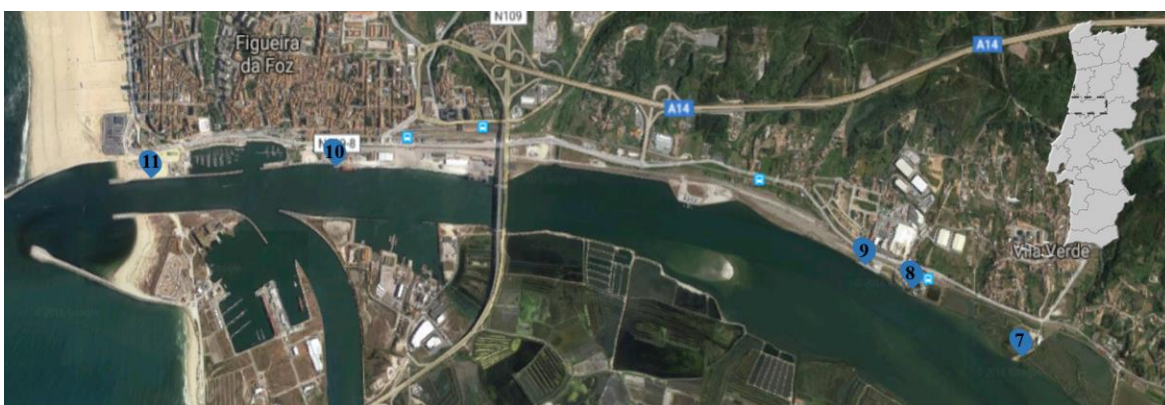


Figura 11. Localização dos locais de amostragem na Figueira da Foz.

Amostras recolhidas no estuário do rio Mondego na Figueira da Foz:

- **Ponto 7:** Antes da ETAR de Vila Verde;
- **Ponto 8:** Na zona da descarga;
- **Ponto 9:** A 350 m da descarga;
- **Ponto 10:** A 3500 m da descarga;
- **Ponto 11:** A 4500 m da descarga.

Todas as amostras foram, nas três campanhas de amostragem, sujeitas a caracterização, através de UV-vis e medindo os parâmetros DOC, pH e salinidade.

2.4. Aplicação da DLLME para posterior quantificação de E2 e EE2 por ELISA

2.4.1. Metodologia para DLLME

Alíquotas de 8 mL de amostras e padrões foram pipetadas para tubos de ensaio de fundo cônico, com capacidade de 10 mL. Em cada tubo injetou-se rapidamente uma mistura contendo 2000 µL de acetona e 200 µL de clorobenzeno, agitando-se imediatamente num vórtex, durante 30 seg. Após a formação de uma solução nebulosa, os tubos foram tapados com ParafilmTM e centrifugados a 4000 rpm, durante 5 min. Graças à separação de fases, a fase orgânica ficou sedimentada no fundo cônico do tubo. O sobrenadante foi descartado e a fase orgânica extraída para um frasco de 2 mL e seca sob uma corrente de azoto. As amostras foram recuperadas em 160 µL de água ultrapura, agitadas no vórtex durante cerca de 20 seg e posteriormente analisadas por ELISA.

2.4.2. Metodologia para ELISA

Um ensaio ELISA competitivo direto foi adaptado para a análise do E2 e do EE2. Microplacas de ELISA com 96 poços foram incubadas durante, pelo menos, 18 h, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente, com uma solução de Ab policlonal (1:25 000) diluída em *coating buffer* (15 mmol L⁻¹ Na₂CO₃, 35 mmol L⁻¹ NaHCO₃, 3 mmol L⁻¹ NaN₃; pH 9,6), usando 200 µL por poço, e tapadas com ParafilmTM para evitar evaporação. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com tampão de lavagem (43 mmol L⁻¹ KH₂PO₄, 375 mmol L⁻¹ K₂HPO₄, 1,33 mmol L⁻¹ C₆H₇KO₂, 3% TweenTM 20, pH 7,6) diluído 60 vezes. De seguida, foram pipetados 25 µL por poço de solução de BSA (*sample buffer*, 1 mol L⁻¹ C₄H₁₁NO₃, 1,5 mol L⁻¹ NaCl, 107 mmol L⁻¹ Na₂EDTA·2H₂O, 1% (m/v) BSA, pH 6,4) e as amostras (100 µL por poço). As placas foram tapadas com ParafilmTM e incubadas durante 30 min, com agitação a 750 rpm. Seguidamente, foi adicionado o T (1:100 000) diluído em solução tampão fosfato (PBS, do inglês *phosphate buffer solution*)

(10 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄·2H₂O, 70 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄·2H₂O, 145 mmol L⁻¹ NaCl, pH 7,6), 100 µL por poço, e incubou-se nas condições anteriores, durante 15 min. Seguiram-se três ciclos de lavagem, após os quais foi adicionado o substrato (200 µL por poço), uma solução preparada no momento, consistindo em 540 µL de solução de TMB (41 mmol L⁻¹ C₁₆H₂₀N₂ (TMB), 8 mmol L⁻¹ C₁₆H₄₀BN (TBABH), em 10 mL DMA), 22 mL de tampão citrato (220 mmol L⁻¹ C₆H₇KO₇, 0,5 mmol L⁻¹ C₆H₇KO₂, pH 4,0) e 8,1 µL H₂O₂. As placas foram incubadas durante 30 min, com agitação a 750 rpm. Por fim, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ a cada poço.

Para a construção da curva de calibração, uma série de 8 padrões de concentrações compreendidas entre 0,000002 e 20 µg L⁻¹ no caso do EE2 e 0,00002 e 200 µg L⁻¹ no caso do E2, foi preparada em água ultrapura e sujeita ao mesmo processo de extração aplicado às amostras. A DO foi lida a 450 nm e todas as amostras e padrões foram analisadas em triplicado.

2.5. Metodologia de ELISA para a CBZ

Um ensaio ELISA competitivo direto foi adaptado para a análise de CBZ. Microplacas de ELISA com 96 poços foram incubadas durante, pelo menos, 18 h, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente, com uma solução de Ab policlonal (anti rato IgG, 1 mg L⁻¹, 200 µL por poço) diluída em PBS, e tapadas com ParafilmTM para evitar evaporação. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com tampão de lavagem. De seguida, a placa foi novamente incubada com uma solução de Ab monoclonal (anti-CBZ 12,9 µg L⁻¹, 200 µL por poço) diluída em PBS durante 60 min com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com *wash buffer*. De seguida, foi pipetada uma solução de *T* (177 pmol L⁻¹), diluída em tampão da amostra (1 mol L⁻¹ glicina, 2% (m/v) EDTA, 3 mol L⁻¹ NaCl, pH 10,5, 50 µL por poço), seguida das amostras (150 µL por poço). A placa foi tapada com ParafilmTM e incubada durante 30 min, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente. Seguiram-se três ciclos de lavagem, após os quais foi adicionado o substrato (200 µL por poço; consistindo em 540 µL de solução de TMB, 21,5 mL de tampão citrato e 8,4 µL H₂O₂). A placa foi incubada durante 30 min, com agitação a 750 rpm. Por fim, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ a cada poço.

Para a construção da curva de calibração, uma série de 8 padrões de concentrações compreendidas entre 0,00001 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi preparada em água ultrapura. A DO foi lida a 450 nm e todas as amostras e padrões foram analisadas em triplicado.

2.6. Metodologia de ELISA para a CET

Um ensaio ELISA competitivo direto foi adaptado para a análise de CET. Microplacas de ELISA com 96 poços foram incubadas durante, pelo menos, 18 h, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente, com uma solução de Ab policlonal (anti-rato IgG, 1 mg L^{-1} , 200 μL por poço) diluída em PBS, e tapadas com ParafilmTM para evitar evaporação. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com tampão de lavagem. De seguida, a placa foi novamente incubada com uma solução de Ab monoclonal (anti-CBZ 12,9 $\mu\text{g L}^{-1}$, 200 μL por poço) diluída em PBS durante 60 min com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com *wash buffer*. De seguida foi pipetada com uma solução de *T* (177 pmol L^{-1}) diluída em tampão da amostra (1 mol L^{-1} citrato, 3 mol L^{-1} NaCl, pH 4,5, 50 μL por poço), seguida das amostras (150 μL por poço). A placa foi tapada com ParafilmTM e incubada durante 30 min, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente. Seguiram-se três ciclos de lavagem, após os quais foi adicionado o substrato (200 μL por poço, consistindo em 540 μL de solução de TMB, 21,5 mL de tampão citrato e 8,4 μL H_2O_2). A placa foi incubada durante 30 min, com agitação a 750 rpm. Por fim, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 μL de 1 mol L^{-1} H_2SO_4 a cada poço.

Para a construção da curva de calibração, uma série de 8 padrões de concentrações compreendidas entre 0,00001 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi preparada em água ultrapura. A DO foi lida a 450 nm e todas as amostras e padrões foram analisadas em triplicado.

2.7. Metodologia de ELISA para a CAF

Um ensaio ELISA competitivo direto foi adaptado para a análise da CAF. Microplacas de ELISA com 96 poços foram incubadas durante, pelo menos, 18 h, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente, com uma solução de Ab policlonal (anti rato IgG, 1 mg L^{-1} , 200 μL por poço) diluída em PBS e tapadas com ParafilmTM para evitar

evaporação. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com *wash buffer*. De seguida, a placa foi novamente incubada com uma solução de Ab monoclonal (anti-CAF 1:100 000) diluído em solução tampão TRIS, durante 90 min, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente. Após a incubação, foram efetuados 3 ciclos de lavagem com tampão de lavagem. De seguida foram pipetados 25 µL de solução de BSA (sample buffer 1 mol L⁻¹ C₄H₁₁NO₃, 1,5 mol L⁻¹ NaCl, 107 mmol L⁻¹ Na₂EDTA·2H₂O, 1% (m/v) BSA, pH 7,6), as amostras (100 µL por poço) e ainda uma solução de *T* (1:100 000) diluída em solução tampão TRIS (100 µL por poço). A placa foi tapada com ParafilmTM e incubada durante 40 min, com agitação a 750 rpm, à temperatura ambiente. Seguiram-se três ciclos de lavagem, após os quais foi adicionado o substrato (200 µL por poço; composição idêntica à especificada no ponto 2.1). A placa foi incubada durante 30 min, com agitação a 750 rpm. Por fim, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 100 µL de 1 mol L⁻¹ H₂SO₄ a cada poço.

Para a construção da curva de calibração, uma série de 8 padrões de concentrações compreendidas entre 0,0001 e 500 µg L⁻¹, foi preparada em água. A DO foi lida a 450 nm e todas as amostras e padrões foram analisadas em triplicado.

3. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1. Adaptação da técnica ELISA para aplicação na determinação de E2 e EE2 em amostras ambientais

3.1.1. Otimização das diluições de Ab e de T

3.1.2. Efeito da matéria orgânica na utilização da DLLME na quantificação de E2 e EE2 por ELISA.

3.2. Adaptação da técnica ELISA para determinação de CAF, CBZ e CET em amostras ambientais

3.2.1. Otimização das diluições de Ab e de T

3.3. Determinação de E2, EE2, CBZ, CET e CAF em amostras reais

3.3.1. Caracterização das amostras

3.3.2. Variação sazonal

3.3.3. Variação espacial

3.1. Adaptação da técnica ELISA para aplicação na determinação de E2 e EE2 em amostras ambientais

3.1.1. Otimização das diluições de Ab e de T

Com o objetivo de obter ensaios ELISA com a maior sensibilidade possível, realizaram-se alguns testes com diferentes combinações de diluições de Ab e de T.

Para o ensaio do E2, o Ab e o T foram testados nas seguintes diluições: Ab 1:5 000, T 1:50 000; Ab 1:10 000, T 1:5 000; Ab 1:10 000, T 1:7 500; Ab 1:25 000, T 1:5 000. Na Figura 12, apresentam-se as respectivas curvas e os parâmetros 4PL são apresentados na Tabela 13.

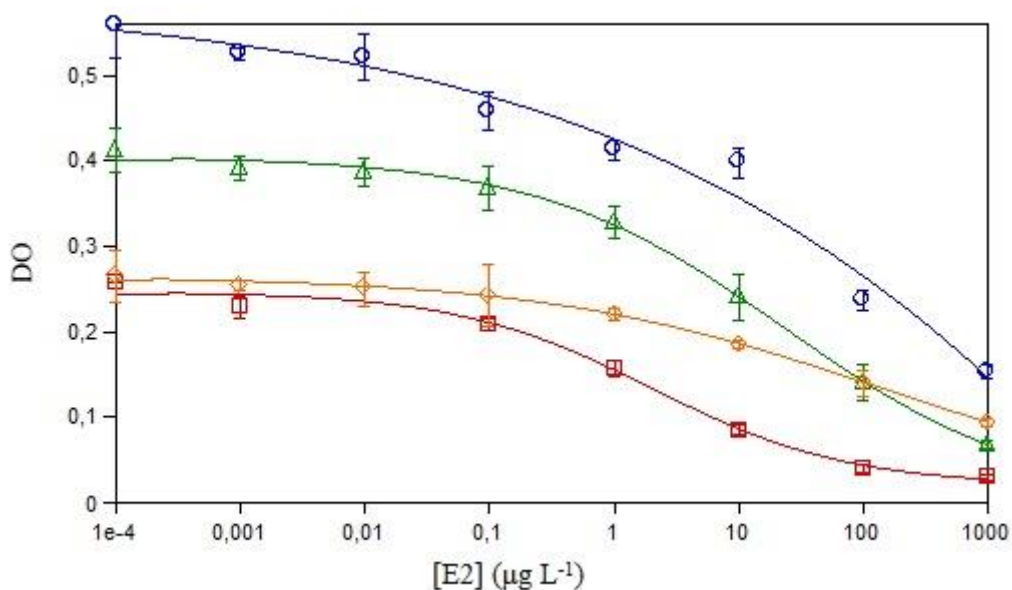


Figura 12. Curvas de calibração do E2 usando diferentes combinações de diluições de Ab e T. Ab 1:5 000, T 1:50 000 – vermelho; Ab 1:10 000, T 1:5 000 – azul; Ab 1:10 000, T 1:7 500 – verde; Ab 1:25 000, T 1:5 000 – laranja.

Tabela 13. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para o E2.

Diluições Ab/T	A	B	C	D	r^2
Ab 1:5 000, T 1:50 000	0,245	0,553	2,07	0,00193	0,993
Ab 1:10 000, T 1:5 000	0,546	0,274	144	-0,0828	0,993
Ab 1:10 000, T 1:7 500	0,403	0,439	24,3	0,00115	0,998
Ab 1:25 000, T 1:5 000	0,274	0,192	$9,24 \times 10^4$	-0,34	0,993

A combinação Ab 1:5 000, T 1:50 000, foi a combinação escolhida, uma vez que, apesar de não apresentar a maior diferença de DO (diferença entre os parâmetros A e D), apresentou um valor de C (associado à sensibilidade do ensaio) consideravelmente mais baixo que as restantes.

Para o ensaio do EE2, foram testadas as seguintes combinações de diluições de Ab e T: Ab 1:25 000, T 1:100 000; Ab 1:50 000, T 1:100 000; Ab 1:50 000, T 1:50 000; Ab 1:50 000, T 1:75 000. Na Figura 13 apresentam-se as respectivas curvas e na Tabela 14 os parâmetros 4PL relativos às diferentes diluições.

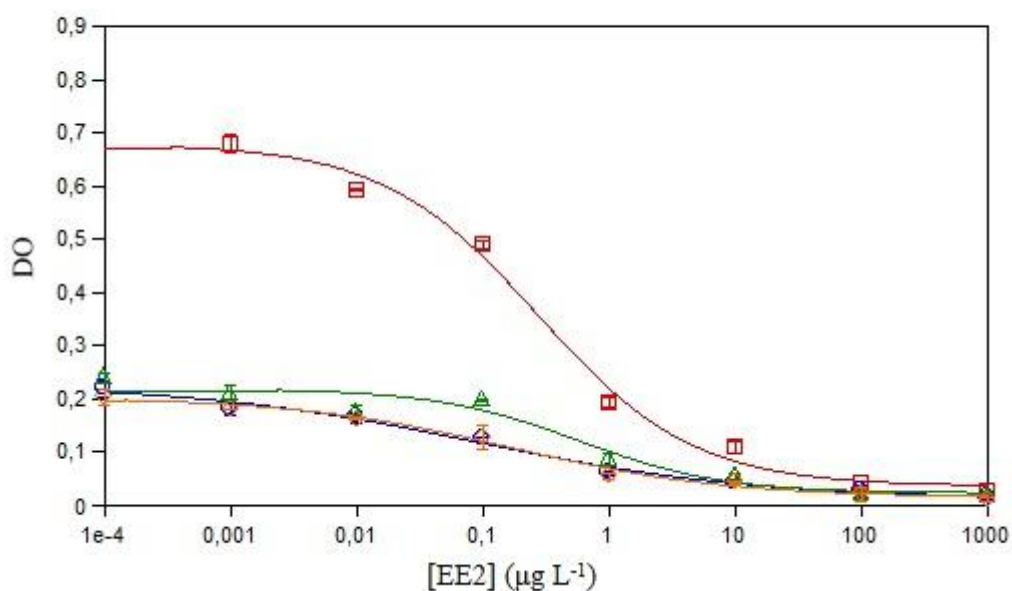


Figura 13. Curvas de calibração usando diferentes combinações de diluições de Ab e T. Ab 1:25 000, T 1:100 000 – vermelho; Ab 1:50 000, T 1:100 000 – azul; Ab 1:50 000, T 1:50 000 – verde; Ab 1:50 000, T 1:75 000 – laranja;

Tabela 14. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para o EE2.

Diluições Ab/T	A	B	C	D	r^2
Ab 1:25 000, T 1:100 000	0,676	0,708	0,277	0,0346	0,99
Ab 1:50 000, T 1:100 000	0,225	0,390	0,0876	0,0105	0,99
Ab 1:50 000, T 1:50 000	0,218	0,762	0,586	0,0217	0,96
Ab 1:50 000, T 1:75 000	0,201	0,502	0,167	0,0134	0,99

No caso do EE2, a combinação Ab 1:25 000, T 1:100 000 foi a escolhida por apresentar o menor valor de C não tendo em conta a curva a laranja. Esta, apesar de um valor de C ligeiramente menor, apresentou um valor de A (DO máxima) mais baixo e uma diferença entre A e D (i.e., pequena diferença entre a DO máxima e a DO mínima) consideravelmente menor. Além disso, não apresentou o formato de curva sigmoidal.

3.1.2. Efeito da matéria orgânica na utilização da DLLME na quantificação de E2 e EE2 por ELISA

A matéria orgânica dissolvida é considerada um potencial interferente de matriz. Silva et al. (2013) realizaram um estudo onde avaliaram a presença e ausência de um tampão constituído por BSA na quantificação das hormonas E2 e EE2 por ELISA e concluíram que este tampão minimizava a forte interferência da matéria orgânica.

O E2 e o EE2 são encontrados no ambiente aquático em concentrações muito baixas é necessário acoplar uma técnica de pré-concentração ao ELISA. Uma vez que a técnica de pré-concentração escolhida foi a DLLME, tornou-se importante avaliar o efeito da matéria orgânica na extração e posterior determinação do E2 e EE2 por ELISA.

Na Figura seguinte (Figura 14) apresentam-se as curvas de calibração obtidas para os padrões de E2 com concentração compreendida entre $0,00002 \mu\text{g L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ na ausência e na presença de AH. Neste ultimo caso a fim de se avaliarem os efeitos da matéria orgânica, a presença desta foi simulada pela adição de uma solução de 20 mg L^{-1} AH aos padrões (Silva et al., 2013). Na Tabela 15 apresentam-se os parâmetros 4PL relativos ao estudo com AH.

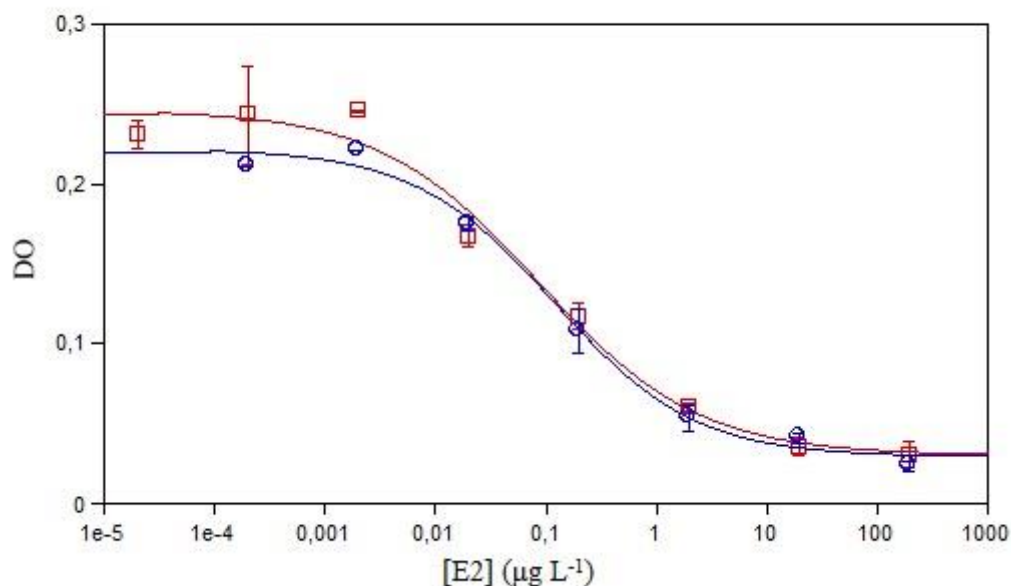


Figura 14. Avaliação do efeito da matéria orgânica num ensaio ELISA para o E2. Ausência de AH - vermelho; presença de 20 mg L⁻¹ AH – azul.

Tabela 15. Parâmetros das curvas 4PL relativas ao E2.

Diluições Ab/T	A	B	C	D	r^2
Ab 1:5 000, T 1:50 000	0,245	0,602	0,0889	0,0296	0,99
	0,221	0,687	0,123	0,0286	0,99

Pela análise das curvas é possível constatar que a curva de calibração do E2, não foi grandemente afetada pela presença de AH, uma vez que os parâmetros da curva com AH mantêm-se praticamente iguais aos parâmetros da curva sem AH. É importante referir que, durante o processo de extração, se recolheu, juntamente com a fase orgânica, a interface orgânica-aquosa, uma vez que se constatou que existia uma pequena quantidade do composto em análise nessa interface.

Na Figura 15, estão representadas as curvas de calibração obtidas para o EE2 com padrões com concentrações compreendidas entre 0,000002 µg L⁻¹ e 20 µg L⁻¹, na ausência e na presença de AH e na Tabela 16 apresentam-se os respetivos parâmetros 4PL.

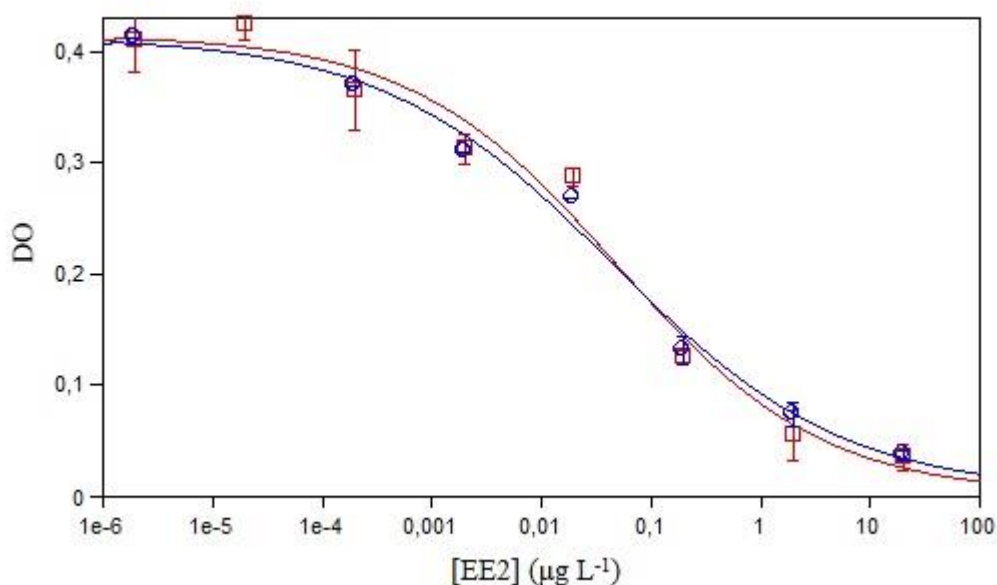


Figura 15. Avaliação da matéria orgânica num ensaio de ELISA para o EE2. Ausência de AH - vermelho; Presença de 20 mg L⁻¹ AH - azul

Tabela 16. Parâmetros das curvas 4PL relativas ao EE2

Diluições Ab/T	A	B	C	D	r^2
Ab 1:25 000, T 1:100 000	0,413	0,463	0,0499	0,00104	0,98
	0,412	0,415	0,0463	0,00326	0,99

Analisando as curvas do EE2 e os parâmetros 4PL, podemos então constatar que a curva de calibração também não foi afetada pela presença de AH.

3.2. Adaptação da técnica ELISA para determinação de CAF e CBZ em amostras ambientais

3.2.1. Otimização das diluições de Ab e de T

Um aspeto interessante do ensaio da CBZ é que a análise das amostras a dois valores de pH diferentes permite considerar a contribuição da CET na concentração total de CBZ quantificada pelo ensaio. Assim, a determinação de CBZ e CET foi realizada no

mesmo ensaio, uma vez que o Ab anti-CBZ também é sensível à CET, dependendo do pH do meio. Assim, na prática, o ensaio realizado a pH 4,5 é mais sensível à determinação da CET, e a pH 10,5 é mais sensível à determinação da CBZ (Calisto, 2011). Desta forma, os dados obtidos podem ser considerados como dados de dois imunoenaios diferentes. Uma vez que no mesmo ensaio são quantificados ambos os compostos, é possível, através da aplicação do sistema de equações que a seguir se apresenta, determinar a concentração real de CET e de CBZ nas amostras:

$$C_{t,pH4,5} = C_{CBZ} + RC_{pH4,5} \times C_{CET} \quad (\text{Eq. 2.4})$$

$$C_{t,pH10,5} = C_{CBZ} + RC_{pH10,5} \times C_{CET} \quad (\text{Eq.2.5})$$

onde C_{CBZ} e C_{CET} são as concentrações de CBZ e de CET, respetivamente, nas amostras; $RC_{pH4,5}$ e $RC_{pH10,5}$ são as reatividades cruzadas a pH 4,5 e a 10,5 respetivamente, e, por fim, $C_{t,pH4,5}$ e $C_{t,pH10,5}$ são as concentrações totais resultantes do ensaio, determinadas com as curvas de calibração da CBZ a pH 4,5 e 10,5, respetivamente.

Foram então testadas as seguintes combinações de diluições de Ab e T: Ab 1: 71667, T 1:400; Ab 1:43 000, T 1:333. As curvas de calibração respetivas estão representadas graficamente na Figura 16 e os parâmetros 4PL apresentam-se na Tabela 17.

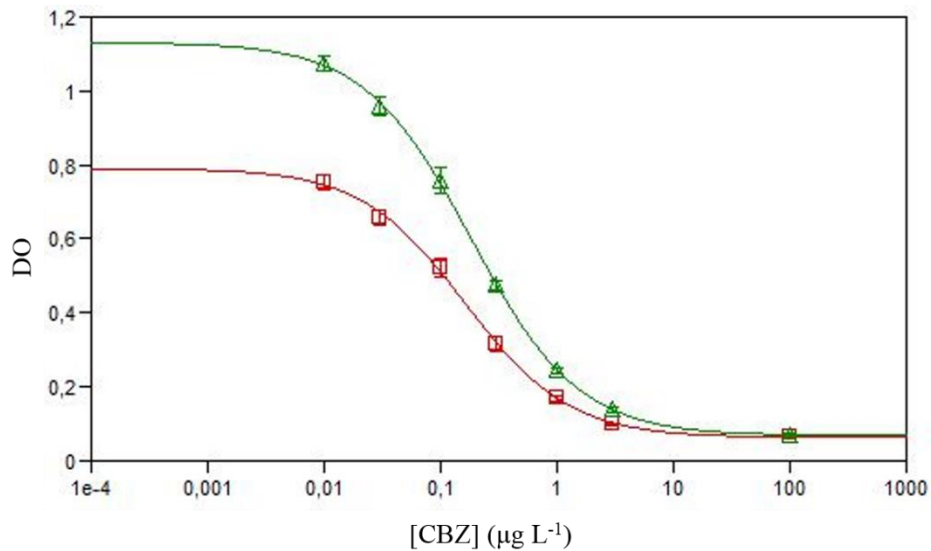


Figura 16. Curvas de calibração usando diferentes diluições de Ab e T. Ab 0,3: 21 500, T 15:6 000 – vermelho; Ab 0,5:21 500, T 18:6 000 – verde.

Tabela 17. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para a CBZ.

Diluições Ab/T	A	B	C	D	r^2
Ab 0,3: 21 500, T 15:6 000	0,791	0,971	0,161	0,0624	0,99
Ab 0,5:21 500, T 18:6 000	1,13	0,946	0,184	0,0676	0,99

A combinação Ab 0,5:21 500, T 18:6 000 foi a escolhida para este ensaio uma vez que apresentou maior DO, e os valores de C das duas curvas não foram significativamente diferentes.

Para o ensaio da CAF, o Ab e o T foram testados nas seguintes diluições: Ab 1:100 000, T 1:100 000; Ab 1:100 000, T 1:300 000; Ab 1:100 000, T 1:500 000; Ab 1:75 000, T 1:300 000. Na Figura 17 apresentam-se as curvas de calibração e os respectivos parâmetros 4PL estão representados na Tabela 18.

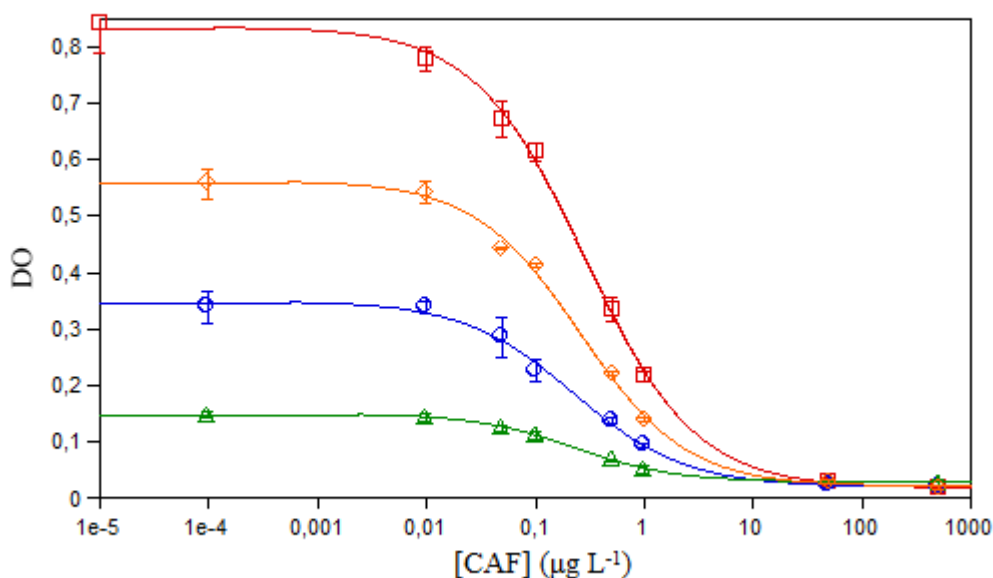


Figura 17. Curvas de calibração usando diferentes combinações de diluições de Ab e T. Ab 1:100 000, T 1:100 000 – vermelho; Ab 1:100 000, T 1:300 000 – azul; Ab 1:100 000, T 1:500 000 – verde; Ab 1:75 000, T 1:300 000 – laranja.

Tabela 18. Parâmetros das curvas 4PL usando diferentes diluições de Ab e de T para a CAF.

Diluições Ab/T	A	B	C	D	r^2
Ab 1:100 000, T 1:100 000	0,833	0,857	0,290	0,0157	0,99
Ab 1:100 000, T 1:300 000	0,347	0,857	0,232	0,0182	0,99
Ab 1:100 000, T 1:500 000	0,147	0,942	0,236	0,0264	1
Ab 1:75 000, T 1:300 000	0,561	0,893	0,265	0,0188	0,99

Para este composto, a combinação Ab 1:100 000, T 1:100 000 foi a escolhida para este ensaio uma vez que, sendo que não se verificaram diferenças consideráveis nos valores de C das curvas, esta foi a combinação que apresentou maior $DO_{\text{máx}}$ (parâmetro A) e maior diferença entre $DO_{\text{máx}}$ e $DO_{\text{mín}}$ (parâmetro D).

3.3. Determinação de E2, EE2, CBZ, CET e CAF em amostras reais

A amostragem realizada neste trabalho compreendeu três recolhas efetuadas nos meses de outubro de 2015 e fevereiro e maio de 2016. Este estudo foi realizado ao longo do Rio Mondego, tendo começado no Parque do Choupal, em Coimbra, e terminado no mar, na Figueira da Foz. A zona em questão apresenta uma grande diversidade – não só foi possível recolher amostras de dois tipos de matriz (doce e salgada) como, no caso das amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego as amostras recebem a influência de áreas quer agrícolas, quer industrializadas, sendo notórias descargas de algumas ETARs no rio em causa.

Considerou-se, assim, importante fazer uma análise sazonal e uma análise espacial dos resultados obtidos, em que, na primeira, se faz uma análise de cada composto para as três recolhas que foram efetuadas e que compreendem as épocas do Outono, Inverno e Primavera, e, na segunda, se faz uma análise de todos os compostos em estudo em cada uma das recolhas ao longo dos onze locais estudados. As amostras recolhidas foram todas caracterizadas antes da sua análise por ELISA.

3.3.1. Caraterização das amostras

3.3.1.1. Carbono Orgânico Dissolvido

As análises de carbono orgânico dissolvido (DOC, do inglês *dissolved organic carbon*) (Tabela 19) evidenciam valores mais elevados de carbono orgânico na primeira amostragem e valores inferiores na terceira amostragem, corroborando o facto de a primeira amostragem ter sido efetuada numa altura com menos chuva e a terceira amostragem numa fase muito mais chuvosa. Verifica-se também que as duas amostras recolhidas próximas da descarga de ETARs (pontos 1 e 8) apresentam os valores de DOC mais elevados. Na última amostragem não foi possível recolher as amostras exatamente nos pontos 1 e 2 por questões de segurança. Assim, foi recolhido apenas um ponto nesta zona (num local intermédio entre os pontos 1 e 2). Este ponto “intermédio” (definido como ponto 2) apresentou um valor de DOC superior, o que se pode justificar pelo facto de esta recolha ter mais influência da descarga da ETAR do que o ponto 2 definido para as amostragens 1 e 2.

Tabela 19. Análises de DOC realizadas às amostras recolhidas nas três amostragens.

	DOC (mg L ⁻¹)		
	1ªAmostragem-outubro de 2015	2ªAmostragem-fevereiro de 2016	3ªAmostragem-maio de 2016
Ponto 1	22,2 ± 0,3	17,8 ± 0,2	n.d.
Ponto 2	3,94 ± 0,01	4,62 ± 0,08	7,03 ± 0,24
Ponto 3	3,73 ± 0,16	2,64 ± 0,13	1,97 ± 0,10
Ponto 4	3,19 ± 0,16	2,37 ± 0,15	1,79 ± 0,37
Ponto 5	4,82 ± 0,12	2,89 ± 0,09	1,72 ± 0,16
Ponto 6	4,42 ± 0,29	4,02 ± 0,13	3,66 ± 0,28
Ponto 7	5,42 ± 0,36	5,37 ± 0,18	2,56 ± 0,23
Ponto 8	7,04 ± 0,35	5,68 ± 0,10	6,39 ± 0,10
Ponto 9	4,89 ± 0,19	3,84 ± 0,16	2,82 ± 0,05
Ponto 10	3,35 ± 0,24	3,81 ± 0,08	2,29 ± 0,10
Ponto 11	3,66 ± 0,22	4,35 ± 0,05	2,37 ± 0,31

3.3.1.2. Espectroscopia UV-Visível

A maioria dos compostos orgânicos absorvem na zona do UV-Vis, sendo esta técnica uma mais valia para avaliar a presença de matéria orgânica em amostras de águas ambientais. Na Figura 18 são apresentados os espectros de UV-vis das amostras recolhidas em cada amostragem.

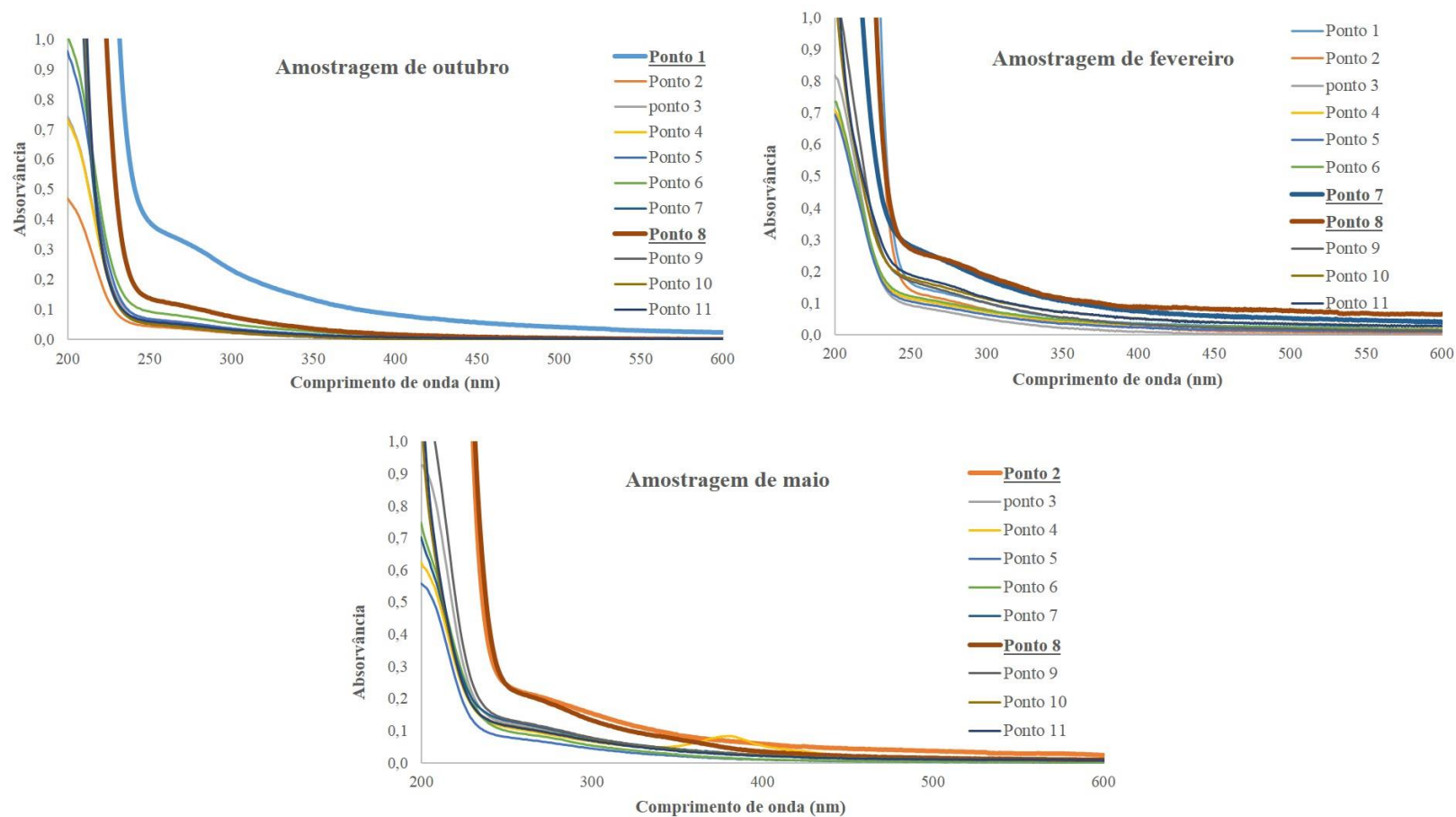


Figura 18. Espectros de UV-Visível das amostras recolhidas.

Analisando os gráficos podemos verificar que, de uma forma geral, os locais onde se observa maior absorvância, logo maior quantidade de matéria orgânica, são os locais 1 e 8, que correspondem às amostras recolhidas próximas das saídas das ETARs.

Na amostragem de outubro, o local 1 apresenta uma absorvância bastante superior aos restantes locais, enquanto que na amostragem de fevereiro, não se verifica uma discrepância de valores tão grande entre as amostras dos diferentes locais como na amostragem anterior, destacando-se apenas os locais 7 e 8.

Na amostragem de maio, são os locais 2 e 8 que apresentam maior absorvância. O local 2 destaca-se nesta amostragem uma vez que foi recolhida num ponto próximo do local 1.

Os resultados observados nesta técnica podem ser relacionados com o DOC, uma vez que o DOC mede a quantidade de carbono orgânico nas amostras e podemos verificar que os resultados obtidos no DOC estão de acordo com os obtidos através de UV-vis.

3.3.1.3. Salinidade e pH

Outra forma de caracterização das amostras considerada, foi a medição da salinidade e do pH.

Quanto à primeira, fez-se a sua medição nas amostras recolhidas em outubro, tendo esta amostragem sido considerada como representativa dos valores de salinidade característicos das amostras nos pontos de amostragem estudados. Como se pode ver na Tabela 20, as amostras dos pontos 1 a 6 referem-se a amostras de água doce recolhidas no rio Mondego perto da cidade de Coimbra, daí a inexistência de salinidade. Já as amostras referentes aos pontos 7, 9, 10 e 11 apresentam valores mais elevados de salinidade, o que era esperado uma vez que se tratam de amostras recolhidas no estuário da Figueira da Foz. De salientar que o valor 0 no ponto 8 é aceitável pois trata-se de uma recolha numa descarga de efluente de uma ETAR.

Tabela 20. Salinidade das amostras recolhidas na amostragem de outubro.

	Salinidade (PSU)
Ponto 1	1
Ponto 2	0
Ponto 3	0
Ponto 4	0
Ponto 5	0
Ponto 6	0
Ponto 7	9
Ponto 8	0
Ponto 9	8
Ponto 10	16
Ponto 11	19

No que respeita ao pH (Tabela 21), os seus valores variaram entre 6,51 e 7,97. Nas amostragens 1 e 2, não são visíveis grandes variações de ponto para ponto. Já na amostragem 3 a variação de ponto para ponto poderá dever-se ao facto de ter sido a amostragem mais chuvosa, e ter tido diferentes influências dependendo das zonas onde foram feitas as recolhas.

Tabela 21. Valores de pH das amostras nas 3 amostragens efetuadas.

	1ªAmostragem- outubro de 2015	2ªAmostragem- fevereiro de 2016	3ªAmostragem- maio de 2016
Ponto 1	7,65	7,76	n.d
Ponto 2	7,63	7,22	7,40
Ponto 3	7,60	7,65	7,12
Ponto 4	7,36	7,46	6,84
Ponto 5	7,32	7,32	6,80
Ponto 6	7,66	7,26	6,51
Ponto 7	7,77	7,76	7,42
Ponto 8	7,86	7,93	6,80
Ponto 9	7,78	7,52	7,30
Ponto 10	7,97	7,64	7,56
Ponto 11	7,90	7,75	7,53

3.3.2. Variação sazonal

Da análise das Figuras 19 e 20, relativas às hormonas em estudo (E2 e EE2), é possível constatar que, de um modo geral, as concentrações obtidas de E2 foram superiores às de EE2, o que era expectável uma vez que o E2 é uma hormona natural. É também reportado na literatura que o EE2 está presente em águas naturais em concentrações muito baixas (Silva et al., 2013). O ponto 1 corresponde ao local de amostragem onde se observaram concentrações mais elevadas de E2 e de EE2 nas duas primeiras amostragens (não foi quantificado na amostragem de maio), o que já era esperado uma vez que corresponde à zona de descarga da ETAR principal de Coimbra. Observando os resultados obtidos no ponto 6 é possível verificar que das três amostragens, a amostragem de maio apresenta valores quer de E2 quer de EE2 bastante superiores. Tal facto pode ser justificado pela existência de um centro hípico perto deste local: devido à elevada precipitação observada neste período podem existir escorrências que, por sua vez, podem levar ao aumento da concentração destes compostos no ambiente aquático. Outra possível razão para estes valores de E2 é o facto do ciclo reprodutivo das éguas iniciar-se na primavera ou verão (Pereira, 2010).

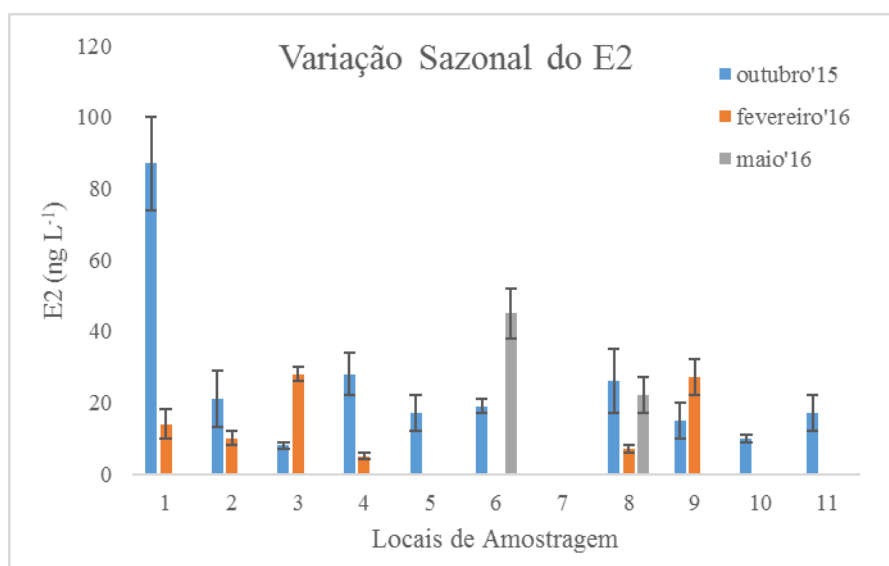


Figura 19. Valores de concentração de E2 quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens.

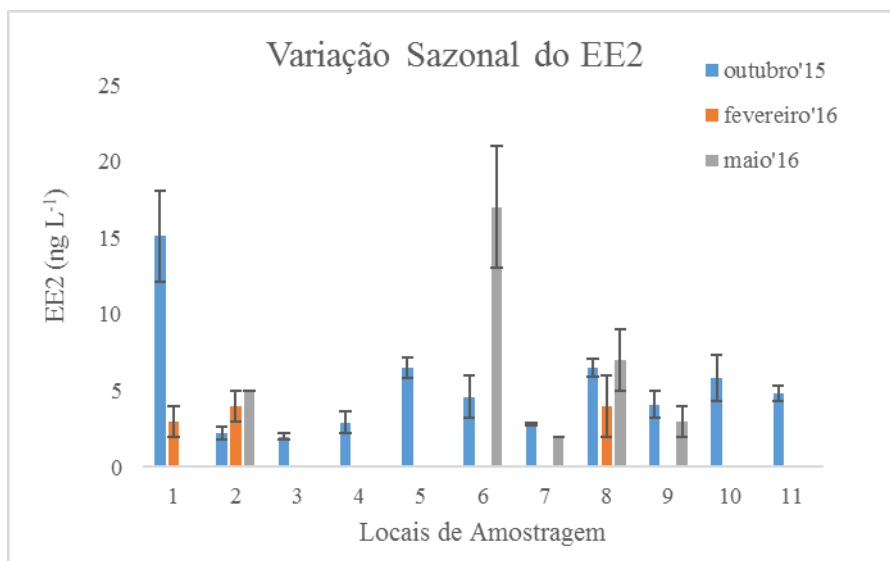


Figura 20. Valores de concentração de EE2 quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens.

Observando as concentrações obtidas para CBZ e CET (Figuras 21 e 22), verifica-se que as mais elevadas foram obtidas na amostragem de maio.

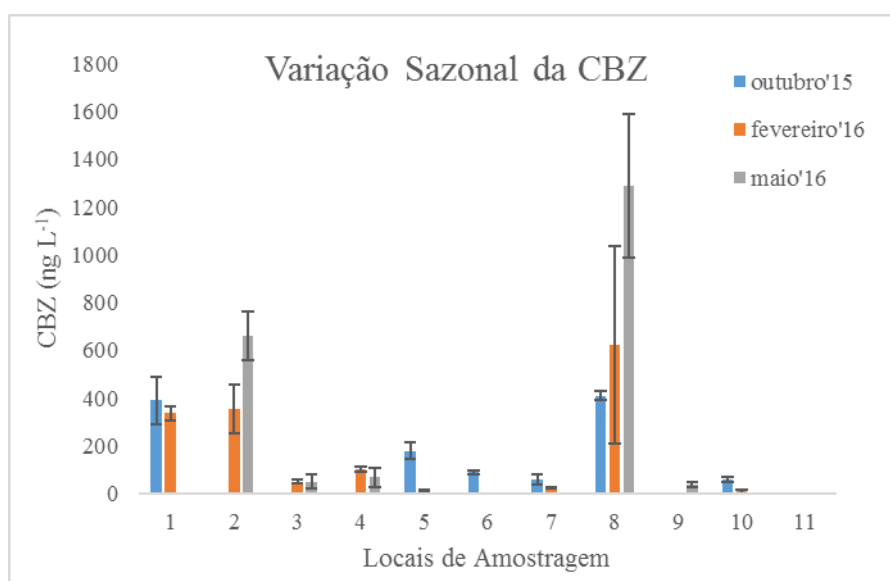


Figura 21. Valores de concentração de CBZ quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens

Em relação à CET, pode verificar-se que, na amostragem de fevereiro, correspondente à estação do Inverno, esta não foi quantificada em nenhum dos pontos estudados. Tal facto pode justificar-se uma vez que a CET, sendo um anti-histamínico, tem

o seu consumo diminuído no Inverno, sendo mais consumida aquando do aparecimento das alergias características da Primavera. Pela mesma razão, a amostragem de maio foi a que revelou concentrações mais elevadas.

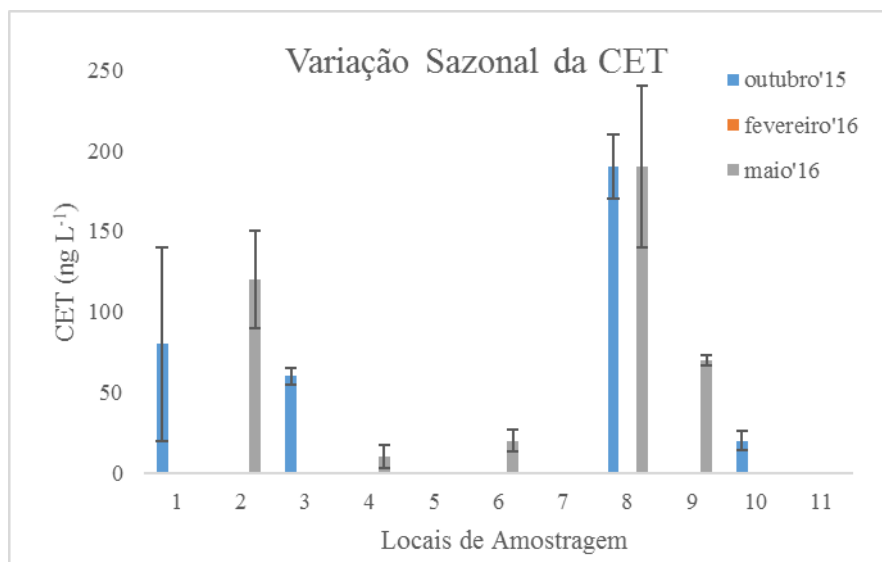


Figura 22. Valores de concentração de CET quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens

No que diz respeito à CAF (Figura 23), a amostragem de outubro revela valores mais elevados deste composto, eventualmente por se ter tratado da amostragem mais seca, e concentrações mais baixas na amostragem de maio. Por fim, pode observar-se ainda que nas amostragens de fevereiro e de maio não se quantificou CAF no ponto 6, o que veio reforçar a ideia de que as águas deste ponto sofrem menor influência da presença humana.

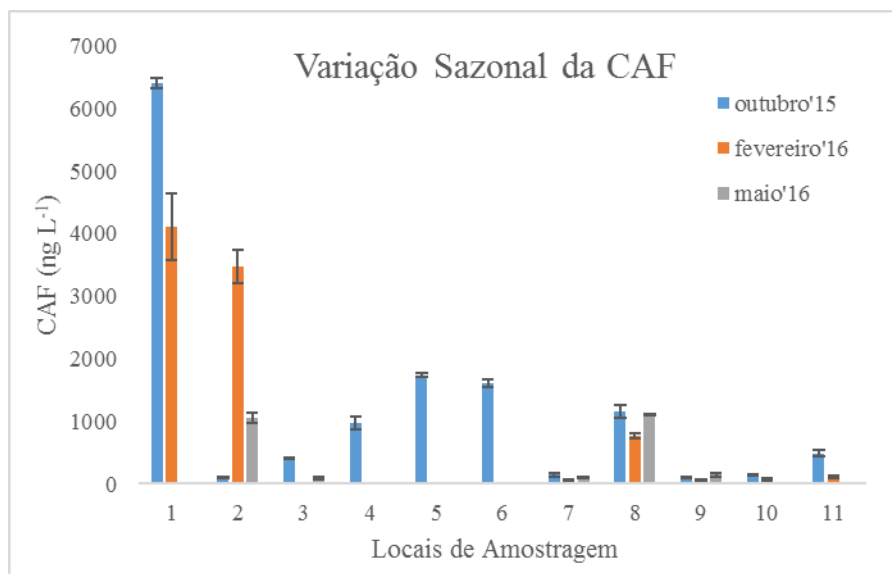


Figura 23. Valores de concentração de CAF quantificados por ELISA em amostras recolhidas ao longo do Rio Mondego nas 3 amostragens.

Em termos meteorológicos, a amostragem mais seca correspondeu a outubro e, ao contrário do que seria de esperar, a mais chuvosa foi a amostragem de maio. Estas observações podem, de um modo geral, relacionar-se com os valores de concentração obtidos. Assim, foi possível verificar que os valores de concentração de E2, EE2, CBZ e CAF foram mais elevados para a amostragem de outubro, enquanto que em maio (considerando uma maior diluição das amostras) não foi possível a quantificação destes compostos em alguns locais. No caso específico da CET, embora a amostragem de maio tenha sido realizada, como se disse, numa época de muita precipitação, as suas concentrações foram elevadas nesta amostragem, o que se considerou expectável uma vez que, nas semanas imediatamente anteriores, o tempo apresentou-se muito quente e seco, sendo mais suscetível ao aparecimento de alergias (i.e. maior consumo esperado de anti-histamínicos, como a CET).

3.3.3. Variação espacial

Analisando a Figura 24, podemos confirmar que as amostras recolhidas nos locais de descarga das ETARs (pontos 1, 2 e 8) apresentam as concentrações mais elevadas para os compostos em estudo. O local 1 (próximo da ETAR do Choupal) evidenciou níveis de concentração superiores aos encontrados no local 8 (ETAR de Vila Verde), sendo justificável pelo facto da ETAR do Choupal servir uma densidade populacional superior à ETAR de Vila Verde. Observam-se variações de concentrações dos compostos ao longo dos locais de amostragem, como era esperado, uma vez que temos diferentes ambientes envolventes, como ETARs, áreas agrícolas e áreas industrializadas. Ainda respeitando às três amostragens, foi possível verificar que os pontos de concentração máxima referentes à concentração de CBZ nos diversos locais acompanharam os pontos de concentração máxima de CAF, o que foi interessante de observar uma vez que ambos são considerados indicadores de poluição antropogénica (Bahlmann et al., 2012).

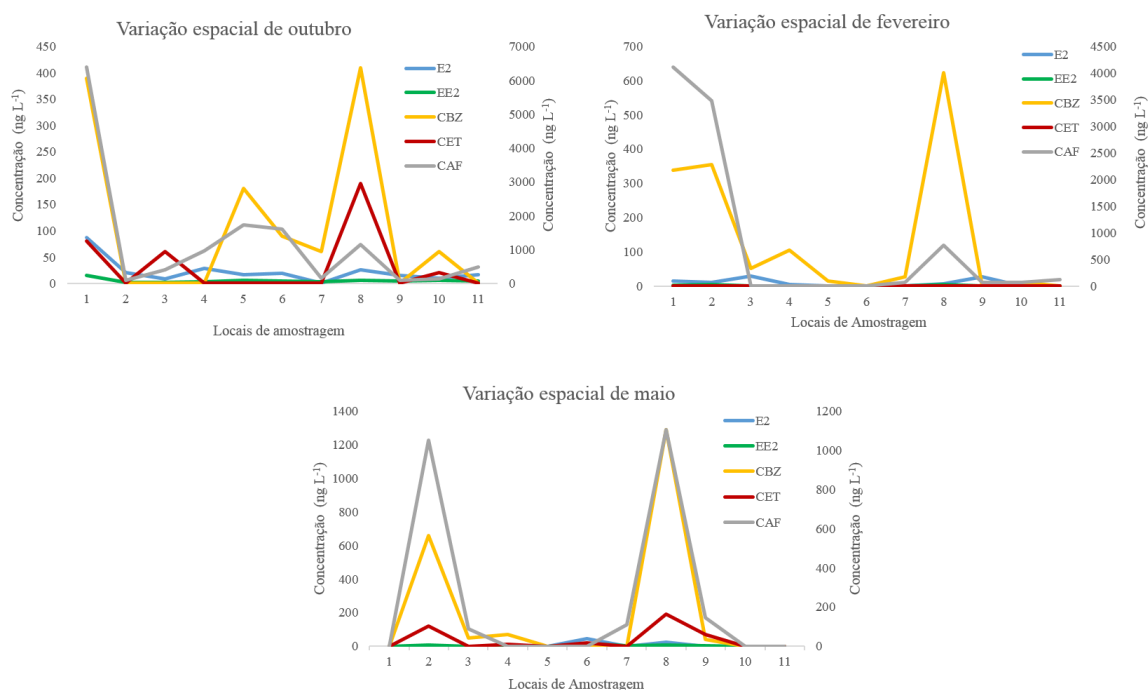


Figura 24. Representação das concentrações dos diferentes compostos ao longo dos pontos de amostragem estudados. Os compostos E2, EE2, CBZ e CET estão representados no eixo principal (à esquerda) e a CAF está representada no eixo secundário (à direita).

Na amostragem de outubro de 2015 verifica-se que o E2 apresenta concentrações superiores às concentrações de EE2. Este facto está de acordo com o esperado uma vez que o E2 se trata de uma hormona natural e o EE2 de uma hormona sintética, mais comumente administrada como anticoncepcional. Do local 1 (descarga do efluente da ETAR do Choupal) para o local 2 (rio Mondego, a 50 m da descarga) nota-se um decréscimo acentuado na concentração de E2. Uma possível explicação é que o E2 apresenta mais tendência a adsorver à fase sólida (Log K_{OA} 3,94) podendo ficar adsorvido à matéria orgânica sólida existente no local. No entanto, não será também de desprezar o fator de diluição.

Em relação à CET podemos verificar que os pontos 1, 3 e 8 são onde se observa maior concentração deste composto por se tratarem de locais próximos de descargas de ETARs. Nos locais 4, 5, 6 e 7, não se quantificou CET uma vez que são locais principalmente agrícolas, com pouca população.

Em relação à CBZ e à CAF podemos verificar que têm um perfil idêntico, o que realça o seu potencial como indicadores de poluição antropogénica.

Tanto a CET como a CAF têm constantes de solubilidade em água muito elevada, o que pode ser também um fator que justifique a concentração elevada destes compostos nas amostras.

No que diz respeito à amostragem de fevereiro de 2016, mais uma vez as concentrações de E2, de EE2, de CBZ e de CAF são superiores nos locais próximos de descargas das ETARs. O perfil da CBZ acompanha o perfil da CAF e não se quantificou CET nesta amostragem.

Por fim, na amostragem de maio de 2016, verifica-se que além dos pontos 2 e 8 (o ponto 1 não foi recolhido devido à inacessibilidade do local, como já foi referido anteriormente), o ponto 6 também apresenta uma concentração considerável de E2 e de EE2. Uma possível justificação para estes valores é a proximidade de um centro hípico sendo que, tal como já foi referido anteriormente, a época em que decorreu esta terceira amostragem corresponde ao início do ciclo reprodutivo das éguas (Pereira, 2010). No que diz respeito à CAF, verificou-se que, nos pontos correspondentes às amostras da Figueira da Foz (pontos de 7 a 11), as concentrações foram inferiores às das amostras referentes a

Coimbra (ponto de 1 a 6), o que pode ser explicado pela densidade populacional da primeira ser inferior à da segunda. Esta relação entre densidade populacional e influência antropogénica (neste caso avaliada pela presença de CAF) já foi reportada na literatura (Buerge et al., 2003).

4. CONCLUSÃO

A monitorização dos contaminantes emergentes abordados neste trabalho é importante, uma vez que se sabe que apresentam efeitos adversos para o ambiente, nomeadamente, ao nível do impacto toxicológico na população aquática. Estes compostos estão presentes em águas superficiais e residuais, sendo que a sua principal fonte no ambiente é a descarga dos efluentes das ETARs.

Neste trabalho, foram otimizados ensaios ELISA de forma a obter métodos simples e rápidos para monitorizar a presença dos estrogénios E2 e EE2, do antiepiléptico CBZ, do anti-histamínico CET e do marcador antropogénico, CAF, em diferentes matrizes aquosas.

Os ensaios ELISA revelaram-se um método promissor na quantificação destes compostos, uma vez que constituem uma técnica de baixo custo, com baixo limite de deteção e que permite fazer várias análises em simultâneo. Além disso, uma das vantagens mais notáveis dos imunoensaios é que podem ser usados sem qualquer pré-tratamento da amostra, pois são uma técnica bastante seletiva. No entanto, sabe-se que os níveis das hormonas no ambiente, principalmente do EE2, são muito baixos exigindo, em alguns casos, métodos de pré-concentração. Assim, recorreu-se a uma metodologia de pré-concentração para posterior quantificação de E2 e de EE2 por ELISA, a DLLME. Esta mostrou-se uma técnica simples, rápida e de baixo custo, permitindo a extração de um grande número de amostras em simultâneo. Além disso, é uma técnica “amiga” do ambiente, uma vez que o volume de solventes orgânicos utilizado é extremamente reduzido.

Como principais conclusões deste trabalho pode dizer-se que:

- Pela análise de DOC, verificou-se que a amostragem de outubro revelou os valores mais elevados de carbono orgânico e a amostragem de maio revelou os valores mais baixos;
- Pela obtenção dos espectros de UV-vis, de um modo geral, verificou-se que os locais 1 e 8 foram os que apresentaram maiores valores de absorvância, indicando a existência de uma maior quantidade de matéria orgânica presente nas amostras; esta observação corroborou a informação obtida pela análise do DOC;
- Foi possível quantificar as duas hormonas, E2 e EE2, verificando-se que as concentrações obtidas de E2 foram superiores às de EE2: o E2 foi quantificado numa gama de concentração compreendida entre 5 e 87 ng L⁻¹ e o EE2 entre 2 e 17 ng L⁻¹;
- A CBZ foi quantificada na gama de concentrações 10-1290 ng L⁻¹;

- A CET foi quantificada numa gama de concentração entre 10 e 190 ng L⁻¹;
- A CAF foi quantificada em concentrações no intervalo 62-6399 ng L⁻¹;
- Os níveis de concentração encontrados para os compostos neste trabalho estão de acordo com os obtidos por outros autores em Portugal, com exceção do E2 que foi encontrado em concentrações mais elevadas no presente trabalho.
- Pela análise espacial dos resultados, concluiu-se que (i) os locais onde foram encontradas concentrações mais elevadas para todos os compostos em estudo foram aqueles mais próximos das descargas de efluentes de ETARs, nomeadamente, nos locais 1 e 8 correspondentes à saída da ETAR do Choupal, em Coimbra, e à saída da ETAR de Vila Verde, na Figueira da Foz, respetivamente; (ii) os níveis de concentração dos compostos foram superiores no local 1 em relação ao local 8 pois a ETAR do Choupal apresenta uma densidade populacional maior que a ETAR de Vila Verde; (iii) nos locais 4, 5 e 6 praticamente não se detetou CAF, sendo isto justificado pelo fato de se tratarem de locais com baixa atividade humana e elevada predominância de animais;
- Pela análise sazonal dos resultados, concluiu-se que (i) na amostragem de fevereiro não se verificou a presença de CET nas amostras, uma vez que se trata de um anti-histamínico usado para combater alergias que não são características do inverno, mas sim bastante utilizado na primavera; (ii) os locais onde se verificaram concentrações mais elevadas de CBZ são aqueles em que se verificaram também maiores concentrações de CAF, pois são ambos considerados marcadores de poluição antropogénica; (iii) foi possível correlacionar alguns resultados obtidos com a pluviosidade.

5. BIBLIOGRAFIA

- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Tyagi, R.D., Adams, C.D., Surampalli, R.Y., 2006. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochem.* 41, 525–539.
- Bahlmann, A., Brack, W., Schneider, R.J., Krauss, M., 2014. Carbamazepine and its metabolites in wastewater: Analytical pitfalls and occurrence in Germany and Portugal. *Water Res.* 57, 104–114.
- Bahlmann, A., Carvalho, J.J., Weller, M.G., Panne, U., Schneider, R.J., 2012. Immunoassays as high-throughput tools: Monitoring spatial and temporal variations of carbamazepine, caffeine and cetirizine in surface and wastewaters. *Chemosphere* 89, 1278–1286.
- Barbosa, M.O., Moreira, N.F.F., Ribeiro, A.R., Pereira, M.F.R., Silva, A.M.T., 2016. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495. *Water Res.* 94, 257–279.
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.E., Park, H.S., 2011. Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Sci. Total Environ.* 409, 4351–4360.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239, 229–246.
- Buerge, I.J., Poiger, T., Müller, M.D., Buser, H., 2003. Caffeine , an Anthropogenic Marker for Wastewater Contamination of Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* 37, 691–700.
- Calisto, V., 2011. Environmental occurrence and fate of psychiatric pharmaceuticals. Universidade de Aveiro, Portugal.
- Calisto, V., Bahlmann, A., Schneider, R.J., Esteves, V.I., 2011. Application of an ELISA to the quantification of carbamazepine in ground, surface and wastewaters and validation with LC–MS/MS. *Chemosphere* 84, 1708–1715.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France).

- Sci. Total Environ. 324, 55–66.
- Chang, H.-S., Choo, K.-H., Lee, B., Choi, S.-J., 2009. The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J. Hazard. Mater.* 172, 1–12.
- Conley, J.M., Symes, S.J., Kindelberger, S.A., Richards, S.M., 2008. Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. *J. Chromatogr. A* 1185, 206–215.
- Cunningham, C., 2014. Development of a targeting mechanism for regeneration of the intervertebral disc. National University of Ireland.
- Decisão de Execução (UE) 2015/495 da Comissão Europeia de 20 de março de 2015 (acedido em http://data.europa.eu/eli/dec_impl/2015/495/oj, em julho de 2016).
- Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 23 de Outubro de 2000 (acedido em <http://data.europa.eu/eli/dir/2000/60/oj>, em novembro de 2015).
- Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 12 de agosto de 2013 (acedido em <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj>, em julho de 2016).
- Du, X., Wang, X., Li, Y., Ye, F., Dong, Q., Huang, C., 2010. Determination of Estrone and 17 β -Estradiol in Water Samples Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by LC. *Chromatographia* 71, 405–410.
- Dudley, R. a., Edwards, P., Ekins, R.P., Finney, D.J., McKenzie, I.G., Raab, G.M., Rodbard, D., Rodgers, R.P., 1985. Guidelines for immunoassay data processing. *Clin. Chem.* 31, 1264–1271.
- Franek, M., Hruska, K., 2005. Antibody based methods for environmental and food analysis: A review. *Vet. Med. (Praha)*. 50, 1–10.
- Gomes, R.L., Lester, J.N., 2003. Endocrine disruptors in receiving Waters, in: *Endocrine Disruptors in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. CRC Press LLC. 177–217.
- Hennion, M.-C., Barceló, D., 1998. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Anal.*

- Chim. Acta 362, 3–34.
- Holliger, P., Hudson, P.J., 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23, 1126–1136.
- Huang, C.-H., Sedlak, D.L., 2001. Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 133–139.
- INFARMED, Ministério da Saúde, 2014. Estatística do Medicamento e Produtos de saúde - 2014.
- Jakimska, A., Kot-Wasik, A., Namieśnik, J., 2014. The Current State-of-the-Art in the Determination of Pharmaceutical Residues in Environmental Matrices Using Hyphenated Techniques. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 44, 277–298.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506.
- Jorgensen, S.E., Halling-Sorensen, B., 2000. Editorial: Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691–699.
- Kosonen, J., Kronberg, L., 2009. The occurrence of antihistamines in sewage waters and in recipient rivers. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 555–564.
- Law, B., 2005. *Immunoassay: A Practical Guide*, Taylor & Francis.
- Lima, D., Silva, P., Schneider, R., Otero, M., Esteves, V., 2014. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for estrogens' quantification by enzyme-linked immunosorbent assay. *Talanta* 125, 102–106.
- Lima, D.D., 2011. *Métodos Analíticos: Destino Ambiental de Poluentes Orgânicos*. Universidade de Aveiro, Portugal.
- Lima, D.L.D., Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V.I., 2013. Low cost methodology for estrogens monitoring in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction and HPLC with fluorescence detection. *Talanta* 115, 980–985.
- Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A. a, 2003. *Endocrine*

- disruptors in the environment (IUPAC Technical Report). Pure Appl. Chem. Schejbal (Czech Republic) 75, 631–681.
- Liu, Z., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2009. Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. Sci. Total Environ. 407, 731–748.
- Martins, M.L., Primel, E.G., Caldas, S.S., Prestes, O.D., Adaime, M.B., Zanella, R., 2012. Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações. Scientia Chromatographica 4, 35–51.
- Mikkelsen, S.R., Cortón, E., 2004. Bioanalytical Chemistry. Wiley-Interscience.
- Nunes, G.S., 2005. Metodos imunoquimicos para análise de contaminantes ambientais: conceitos, estados da arte e perspectivas. Quim. Nova 28, 462–471.
- Oliveira, D., Bravo, Nu., 2014. Evolução na qualidade das águas residuais tratadas na APA/ARH Centro. Ministério do Ambiente, do Ordenamento de Território e Energia e Associação Portuguesa do Ambiente, 2014 (acedido em http://www1.ipq.pt/PT/IPQ/historico_eventos/Documents/Blueprint/Nuno%20Bravo_ARH%20Centro_Mesa%20Redonda_Evolu%C3%A7%C3%A3o%20na%20qualidade%20das%20%C3%A1guas%20residuais%20tratadas.pdf, em novembro 2016).
- Pereira, A., Ferreira, D.C., 2010. Indução da ovulação em éguas. Universidade de Trás-os Montes e Alto Douro.
- Petrovic, M., Barceló, D., 2007. Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. Wilson & Wilsons
- Peuravuori, J., Pihlaja, K., 2009. Phototransformations of selected pharmaceuticals under low-energy UVA-vis and powerful UVB-UVA irradiations in aqueous solutions-the role of natural dissolved organic chromophoric material. Anal. Bioanal. Chem. 394, 1621–1636.
- Pubchem substance (acedido em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/46508368> em julho de 2016).
- Quan, C.S., Liu, Q., Tian, W.J., Kikuchi, J., Fan, S.D., 2005. Biodegradation of an

- endocrine-disrupting chemical, di-2-ethylhexyl phthalate, by *Bacillus subtilis* No. 66. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 702–710.
- Rao, K., Lei, B., Li, N., Ma, M., Wang, Z., 2013. Determination of estrogens and estrogenic activities in water from three rivers in Tianjin, China. *J. Environ. Sci. (China)* 25, 1164–1171.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.-R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* 1116, 1–9.
- Ribeiro, C., Pardal, M.Â., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J., 2009a. Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environ. Monit. Assess.* 149, 183–193.
- Ribeiro, C., Tiritan, M.E., Rocha, E., Rocha, M.J., 2009b. Seasonal and spatial distribution of several endocrine-disrupting compounds in the Douro River estuary, Portugal. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 1–11.
- Ribeiro, C., Ribeiro, A.R., Tiritan, M.E., 2016. Priority Substances and Emerging Organic Pollutants in Portuguese Aquatic Environment: A Review. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 1-44.
- Richardson, S.D., Ternes, T. A, 2011. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 83, 4616–4648.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Ferreira, C., Rocha, E., 2012. Occurrence of endocrine disruptor compounds in the estuary of the Iberian Douro River and nearby Porto Coast (NW Portugal). *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 252–261.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Reis, M., Rocha, E., Pardal, M., 2013a. Determination of seventeen endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in Ria Formosa Lagoon (Portugal). *Environ. Monit. Assess.* 185, 8215–8226.
- Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Reis, M., Rocha, E., Pardal, M.A., 2013b. Determination of 17 endocrine disruptor compounds and their spatial and seasonal distribution in the Sado River Estuary (Portugal). *Toxicol. Environ. Chem.* 95, 237–253.

- Rocha, M.J., Ribeiro, C., Ribeiro, M., 2011. Development and optimisation of a GC-MS method for the evaluation of oestrogens and persistent pollutants in river and seawater samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91, 1191–1205.
- Santos, J.L., Aparicio, I., Callejón, M., Alonso, E., 2009. Occurrence of pharmaceutically active compounds during 1-year period in wastewaters from four wastewater treatment plants in Seville (Spain). *J. Hazard. Mater.* 164, 1509–1516.
- Schneider, C., Schöler, H.F., Schneider, R.J., 2005. Direct sub-ppt detection of the endocrine disruptor ethinylestradiol in water with a chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Chim. Acta* 551, 92–97.
- Shishida, K., Echigo, S., Kosaka, K., Tabasaki, M., Matsuda, T., Takigami, H., Yamada, H., Shimizu, Y., Matsui, S., 2000. Evaluation of Advanced Sewage Treatment Processes for Reuse of Wastewater Using Bioassays. *Environ. Technol.* 21, 553–560.
- Silva, C.P., 2014. Ocorrência e destino de estrogénios e antibióticos nom ambiente, avaliados por metodologias analíticas de baixo custo. Universidade de Aveiro, Portugal.
- Silva, C.P., Lima, D.L.D., Schneider, R.J., Otero, M., Esteves, V.I., 2014. Evaluation of the anthropogenic input of caffeine in surface waters of the north and center of portugal by ELISA. *Sci. Total Environ.* 479–480, 227–232.
- Silva, C.P., Lima, D.L.D., Schneider, R.J., Otero, M., Esteves, V.I., 2013. Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. *J. Environ. Manage.* 124, 121–127.
- Sousa, A., Schönenberger, R., Jonkers, N., Suter, M.J.F., Tanabe, S., Barroso, C.M., 2010. Chemical and biological characterization of estrogenicity in effluents from WWTPs in ria de aveiro (NW Portugal). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 1–8.
- Stamatis, N.K., Konstantinou, I.K., 2013. Occurrence and removal of emerging pharmaceutical, personal care compounds and caffeine tracer in municipal sewage treatment plant in Western Greece. *J. Environ. Sci. Health. B.* 48, 800–13.
- Suzuki, Y., Maruyama, T., 2006. Fate of natural estrogens in batch mixing experiments using municipal sewage and activated sludge. *Water Res.* 40, 1061–9.

- Swart, N., Pool, E., 2007. Rapid detection of selected steroid hormones from sewage effluents using an ELISA in the Kuils River water catchment area, South Africa. *J. Immunoassay Immunochem.* 28, 395–408.
- Ternes, T. A, 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.D., Servos, M., 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225, 81–90.
- Van Emon, J.M., 2001. Immunochemical Applications in Environmental Science. *J. AOAC Int.* 84, 125–133.
- Yao, C., Li, T., Twu, P., Pitner, W.R., Anderson, J.L., 2011. Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid-liquid microextraction using functionalized ionic liquids. *J. Chromatogr. A* 1218, 1556–1566.
- Ying, G.G., Kookana, R.S., Ru, Y.J., 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environ. Int.* 28, 545–551.

6. ANEXOS

Anexo I

Tabela 22. Concentrações obtidas de E2, EE2, CBZ, CET e CAF nos locais de amostragem recolhidos no rio Mondego.

Locais	1ª Amostragem					2ª Amostragem					3ª Amostragem				
	E2	EE2	CBZ	CET	CAF	E2	EE2	CBZ	CET	CAF	E2	EE2	CBZ	CET	CAF
Ponto 1	87 ± 13	15,1 ± 3	390 ± 100	80 ± 60	6399 ± 84	14 ± 4	3 ± 1	338 ± 30	<LDD	4112 ± 534	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Ponto 2	21 ± 8	2,2 ± 0,4	<LDD	<LDD	94 ± 9	10 ± 2	4 ± 1	355 ± 100	<LDD	3472 ± 263	<LDD	5 ± 0	660 ± 100	120 ± 30	1052 ± 81
Ponto 3	8 ± 1	2 ± 0,2	<LDD	60 ± 5	405 ± 13	28 ± 2	<LDD	52 ± 7	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	50 ± 30	<LDD	89 ± 15
Ponto 4	28 ± 6	2,9 ± 0,7	<LDD	<LDD	969 ± 97	5 ± 1	<LDD	104 ± 10	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	70 ± 40	10 ± 7	<LDD
Ponto 5	17 ± 5	6,5 ± 0,7	180 ± 34	<LDD	1739 ± 33	<LDD	<LDD	15 ± 3	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD
Ponto 6	19 ± 2	4,6 ± 1,4	90 ± 10	<LDD	1606 ± 66	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	45 ± 7	17 ± 4	<LDD	20 ± 7	<LDD
Ponto 7	<LDD	2,8 ± 0,1	60 ± 20	<LDD	148 ± 28	<LDD	<LDD	27 ± 3	<LDD	62 ± 13	<LDD	2 ± 0	<LDD	<LDD	110 ± 6
Ponto 8	26 ± 9	6,5 ± 0,6	410 ± 20	190 ± 20	1155 ± 96	7 ± 1	4 ± 2	623 ± 413	<LDD	765 ± 37	22 ± 5	7 ± 2	1290 ± 300	190 ± 50	1107 ± 9
Ponto 9	15 ± 5	4,1 ± 0,9	<LDD	<LDD	102 ± 14	27 ± 5	<LDD	<LDD	<LDD	63 ± 9	<LDD	3 ± 1	40 ± 10	70 ± 3	144 ± 31
Ponto 10	10 ± 1	5,8 ± 1,5	60 ± 10	20 ± 6	143 ± 13	<LDD	<LDD	10 ± 8	<LDD	71 ± 11	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD
Ponto 11	17 ± 5	4,8 ± 0,5	<LDD	<LDD	490 ± 47	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	114 ± 17	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD	<LDD